ORSAY
Série A,
N° d'ordre :

№01069

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

DUPAIX Alain

TITRE : « Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques lors de l'hydrolyse par l'α-chymotrypsine d'esters para-nitrophényliques. Etude de la spécificité et de la stéréo-spécificité enzymatique. »

Soutenue le 13-2-1973 devant la Commission d'examen

M. J. TONNELAT — Président

M. M. VILKAS — Examinateurs

Mlle J. YON

M. G. NEMETHY

ORSAY
Série A,
N° d'ordre :

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

DUPAIX Alain

TITRE : "Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques lors de l'hydrolyse par l'α-chymotrypsine d'esters para-nitrophényliques. Etude de la spécificité et de la stéréo-spécificité enzymatique."

Soutenue le 13-2-1973 devant la Commission d'examen

M.	J. TONNELAT	Président
M.	M. VILKAS	Examinateurs
Mlle	J. YON	
M.	G. NEMETHY	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Le présent travail a été effectué au laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire, Groupe de Recherches du C.N.R.S. associé à l'Université de Paris-Sud, sous la direction de Melle J. YON, Directeur de Recherches au C.N.R.S. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude pour le soutien scientifique et moral qu'elle apporte aux chercheurs de son groupe.

Ce travail est celui d'une équipe et le hasard m'a déterminé pour l'exposer aujourd'hui. Je remercie très sincèrement J.J. BECHET pour la part prépondérante qu'il y a prise. J'exprime à Mme C. ROUCOUS toute ma reconnaissance pour sa participation assidue à notre travail.

Je remercie Messieurs les Professeurs J. TONNELAT, M. VILKAS et G. NEMETHY d'avoir bien voulu s'intéresser à ce mémoire et d'avoir accepté de constituer ce jury de thèse.

INTRODUCTION

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544710_0022

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, l'étude de nombreuses réactions organiques a montré que l'influence de la structure des réactifs sur l'énergie libre d'activation peut être fréquemment analysée, avec une bonne approximation, comme la somme de contributions indépendantes des effets polaires, stériques, et de résonance des substituants (L.P. HAMMETT 1940, 1970 ; H.H. JAFFE 1953 ; R.W. TAFT Jr 1956 ; J.E. LEFFLER et E. GRUNDWALD 1963 ; P.R. WELLS 1968). Un tel type de relation, L.F.E.R.*, permet d'assigner aux éléments ou groupes chimiques des valeurs numériques traduisant ces différents effets que l'on pourra alors associer aux vitesses de réaction ou aux équilibres chimiques. En d'autres termes, la quantification et la séparation de ces effets doivent permettre de prévoir les constantes d'équilibres et les constantes de vitesse des réactions. Deux types de relations sont généralement utilisés à cette fin : l'équation de HAMMETT et l'équation de TAFT-INGOLD.

Equation d'HAMMETT

L'équation d'HAMMETT (1940) se rapporte à l'influence des substituants sur la réactivité des substrats aromatiques :

$$\log k/k_0 = \rho \sigma \qquad (1)$$

Dans cette équation, k et k_0 représentent respectivement les constantes de vitesse de la réaction pour les composés de

---

* L.F.E.R. pour Linear Free Energy Relationships. Nous avons conservé ce sigle rencontré le plus fréquemment dans la littérature.

substituants R et H ; σ est une constante relative au substituant, indépendante de la nature de la réaction ; elle mesure quantitativement l'effet polaire du substituant par rapport à l'atome d'hydrogène pour lequel σ est égal à zéro.

- $\sigma > 0$ pour les substituants attracteurs d'électrons (Br, I, Cl ...)

- $\sigma < 0$ pour les substituants donneurs (NH_2, OH, OCH_3 ...)

ρ est une constante de proportionnalité, fonction de la nature de la réaction et de ses conditions (température, solvant). ρ mesure la sensibilité d'une réaction aux effets polaires des substituants : pour une réaction favorisée par des substituants attracteurs d'électrons, $\rho > 0$ et inversement. Pour obtenir ces constantes, HAMMETT a choisi comme réaction standard ($\rho=1$) l'ionisation des acides benzoïques substitués :

$$\log K/K_o = \sigma \qquad (2)$$

Nous ne nous étendrons pas davantage sur l'équation d'HAMMETT qu'il importait néanmoins de mentionner car elle est à l'origine de la relation linéaire d'énergie libre utilisée dans ce travail : l'équation de TAFT-INGOLD.

Equation de TAFT-INGOLD

En 1952, TAFT propose une relation linéaire d'énergie libre, dérivée de celle de HAMMETT, permettant la séparation des effets polaires et stériques exercés par des substituants

non conjugués R sur les vitesses d'hydrolyse d'esters éthyliques de formule générale $R-\underset{\overset{\|}{O}}{C}-O-C_2H_5$.

L'équation proposée est de la forme :

$$\log k_x/k_o = \rho^* \sigma^* + \delta E_s \qquad (3)$$

où k_x est la vitesse d'hydrolyse d'un ester pour lequel R = X, k_o celle du composé de référence : l'acétate d'éthyle ; σ^* et E_s sont les constantes polaires et stériques caractéristiques du substituant R ; ρ^* et δ les constantes polaires et stériques de la réaction. Les valeurs de σ^* et E_s sont établies empiriquement à partir de l'étude comparée des vitesses d'hydrolyse acide et alcaline des esters éthyliques.

En effet, l'hydrolyse acide de ces esters est pratiquement insensible à la polarité des substituants du fait de la compensation de ces effets dans les différentes étapes du processus d'hydrolyse ; elle est sensible aux seuls effets stériques par suite de la différence d'encombrement exercé par le substituant dans l'état fondamental où le carbone du site réactionnel est trigonal et dans l'état de transition où il est tétraédrique. Appliquée à l'hydrolyse acide des esters éthyliques, l'équation de TAFT se résume à :

$$\log (k_x/k_o)_A = E_s \qquad (4)$$

permettant ainsi la mesure de l'effet stérique associé à un substituant donné.

Hydrolyse Acide

Hydrolyse Basique

Figure 1

Hydrolyse acide et basique d'esters d'acides carboxyliques : états de transition (d'après Wells, 1962).

Par contre, l'hydrolyse alcaline de ces composés est sensible à la fois à la polarité et à l'encombrement des substituants. Toutefois, les configurations des états de transitions formés lors des hydrolyses acide et alcaline sont très peu différentes : deux protons supplémentaires pour l'état de transition dans l'hydrolyse acide (cf Fig. 1). Il est donc raisonnable de supposer que les effets stériques sont identiques lors des deux réactions, l'équation de TAFT prenant la forme :

$$\log (k_x/k_o)_B = 2{,}48\,\sigma^* + E_s \qquad (5)$$

En combinant les équations 4 et 5, il vient :

$$\log (k_x/k_o)_B - \log (k_x/k_o)_A = 2{,}48\,\sigma^* \qquad (6)$$

d'où la possibilité d'accéder aux valeurs de σ^* pour chaque substituant considéré. Dans l'équation (6), ρ^* a été choisi par TAFT égal à 2,48 afin d'exprimer les valeurs de σ^* dans la même échelle de grandeur que les valeurs de σ données par HAMMETT (TAFT 1952).

Cette analyse s'est trouvée vérifiée pour un certain nombre de réactions de la chimie organique ; néanmoins, beaucoup d'entre elles ne font pas apparaître un tel type de corrélation. Il peut y avoir plusieurs raisons à cette situation, par exemple un changement d'étape limitante, des mécanismes réactionnels compétitifs dont l'importance varie avec la nature des substituants. Mais, dans quelques cas, il est possible de suggérer l'utilisation des déviations observées comme moyen de

mesurer d'autres variables, particulièrement des effets de résonance, des interactions d'hyperconjugaison, la participation de groupes voisins (TAFT 1952, HANCOCK et coll. 1961).

Le mécanisme d'action des enzymes n'est pas fondamentalement différent de celui de toute autre réaction organique. En particulier, la nature covalente de nombreux intermédiaires dans la catalyse enzymatique rend possible l'application des techniques de la chimie organique physique qui ont permis d'élucider, avec d'autres moyens d'approche, les mécanismes des réactions non enzymatiques. On peut donc penser à rechercher des corrélations du genre de celles d'HAMMETT ou de TAFT entre les constantes cinétiques de la catalyse enzymatique et les constantes caractéristiques de divers substrats, et tenter d'analyser certaines déviations observées.

Un nombre limité de corrélations a été trouvé entre les structures de substrats et leurs réactivités relatives dans un système enzymatique donné. BENDER et NAKAMURA (1962), CAPLOW et JENCKS (1962) ont été les premiers à utiliser une telle démarche pour l'étude du mécanisme de l'α-chymotrypsine. Bien que de nombreuses études sur la spécificité de l'α-chymotrypsine soient rapportées dans la littérature (NIEMANN, 1964 ; INGLES et KNOWLES, 1967 ; INGLES et KNOWLES, 1968 ; COHEN et coll., 1969 ; HAYASHI et LAWSON, 1969 ; SILVER et coll., 1970), les raisons intimes de cette spécificité sont encore mal comprises.

Du fait de leur grande réactivité, les esters de paranitrophénol sont des substrats de choix devant permettre l'analyse de cette spécificité. En effet, la nature du groupe acylant le carbonyle de l'ester peut être modifiée sans changer l'étape limitante de la réaction (ZERNER et BENDER, 1964 ; INGLES et KNOWLES, 1967). L'α-chymotrypsine catalyse l'hydrolyse des composés carboxyliques selon un mécanisme de catalyse générale basique (BENDER et KEZDY, 1965). Les effets des substituants lors de l'hydrolyse catalysée par l'enzyme peuvent être comparés avec les effets observés lors de l'hydrolyse alcaline. Nous avons donc appliqué l'analyse de TAFT à l'hydrolyse chymotrypsique d'esters de paranitrophénol de formules générales $RCOOC_6H_4pNO_2$ et $\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}\!\!>\!CHCOOC_6H_4pNO_2$ dans le but de séparer les effets polaires, stériques et spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- BENDER, M.L., NAKAMURA, K. (1962) J. Amer. Chem. Soc. 84, 2577

- BENDER, M.L., KEZDY, F.J. (1965) Annu. Rev. Biochem. 34, 49

- CAPLOW, M., JENCKS, W.P. (1962) Biochemistry 1, 883

- COHEN, S.G., MILOVANOVIC, A., SCHULTZ, R.M., WEINSTEIN, S.Y. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2664

- HAMMETT, L.P. (1940) dans "Physical Organic Chemistry", Mc Graw Hill Book Company, New-York

- HAMMETT, L.P. (1970) dans "Physical Organic Chemistry", 2nd edition, Mc Graw Hill Book Company, New-York

- HANCOCK, G.K., MEYERS, E.A., YAGER, B.J. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 4211

- HAYASHI, Y., LAWSON, W.B. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4158

- INGLES, D.W., KNOWLES, J.R. (1967) Biochem. J. 104, 369

- INGLES, D.W., KNOWLES, J.R. (1968) Biochem. J. 108, 561

- JAFFE, H.H. (1953) Chem. Revs. 53, 191

- LEFFLER, J.E., GRUNDWALD, E. (1963) dans "Rates and Equilibria of Organic Reactions", J. Wiley and Sons, New-York

- NIEMANN, C. (1964) Science 143, 1287

- SILVER, M.S., STODDARD, M., SONE, T., MATTA, M.S. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 3151

- TAFT, R.W. Jr. (1952) J. Amer. Chem. Soc. 74, 3120

- TAFT, R.W. Jr. (1956) dans "Steric Effects in Organic Chemistry", Newman, M.S., John Wiley and Sons, New-York

- WELLS, P.R. (1968) dans "Linear Free Energy Relationships", Acad. Press, New-York

- ZERNER, B., BENDER, M.L. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 3669

M A T E R I E L et M E T H O D E S

MATERIEL et METHODES

- Préparation des substrats
- Pouvoirs rotatoires des dérivés d'acides aminés
- Mesure des pK de certains acides aminés N-α-acylés
- Mesures cinétiques

ABREVIATIONS UTILISEES

Hepes, acide N-2-hydroxy-éthylpiperazine-N'-2-éthane sulfonique ; Mes, acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique ; For, formyle ; Ac, acétyle ; Pro, propionyle ; But, butyryle ; Z, benzyloxy-carbonyle ; Bz, benzoyle ; OMe, ester méthylique ; OEt, ester éthylique ; ONp, ester paranitrophénylique ; m.p., point de fusion ; la désignation abrégée des dérivés d'acides aminés respecte les propositions de la commission IUPAC-IUB sur la Nomenclature en Biochimie, (1966), Biochemistry, 5, 1445 et 2485.

PREPARATION DES SUBSTRATS

Les acides carboxyliques et le paranitrophénol employés lors de la synthèse des esters sont des produits commerciaux d'origines diverses. (Schuchardt Chemische Fabrik, Fluka Chemische Fabrik, Aldrich Chemical Co, K and K Laboratories).

L'acétonitrile a été purifié selon la méthode de COETZEE (1967), et les autres solvants selon FIESER (1955). La propionylglycine et la butyrylglycine ont été préparées par action des chlorures d'acides correspondants (produits Schuchardt) sur la glycine en milieu alcalin selon la méthode de BONDI et EISSLER (1910), et recristallisées à partir d'éther éthylique. Les rendements étaient respectivement de 16 et 40%.

Les formyl-D et L-alanine ont été obtenues selon la méthode de SHEEHAN et YANG (1958), par addition d'anhydride acétique à un mélange de D ou de L-alanine et d'acide formique à 98%, à la température de 5°. Après recristallisation dans l'éthanol absolu, les rendements étaient respectivement de 45 et 55%. Les points de fusion et les pouvoirs rotatoires de ces composés étaient : formyl-D-alanine, m.p. = 128-130° ; $[\alpha]_D^{27}$ = + 55° (c 1,NaOH N) ; litt. m.p. = 130° ; $[\alpha]_D^{25}$ = + 57° (c 2, NaOH N) (LEFRANCIER et BRICAS, 1965) ; formyl-L-alanine, m.p. = 130° ; $[\alpha]_D^{27}$ = - 57° (c 1,NaOH N) ; litt. m.p. = 130° ; $[\alpha]_D^{25}$ = - 56° (c 2,NaOH N) (LEFRANCIER et BRICAS, 1965).
La carbobenzoxylation de la D-norvaline et de la L-norleucine a été effectuée selon le processus courant décrit par BERGMAN et ZERVAS (1932). Les huiles obtenues ont été utilisées telles quelles pour la synthèse des esters de paranitrophénol correspondants. Les autres acides aminés protégés sur leur fonction α-aminée provenaient de la Cyclo Chemical Corp.

TABLEAU I : Propriétés générales des esters de paranitrophénol d'acides carboxyliques $RCOOC_6H_4pNO_2$.

	R	Points de Fusion (°C, non corrigés)	Formules brutes	Analyses élémentaires 1) % calculés 2) % trouvés	C %	H %	N %	Cl %
1	$ClCH_2$	97-98.5[a]	$C_8H_6NO_4Cl$					
2	H	71-72[b]	$C_7H_5NO_4$					
3	ICH_2	78-79[c]	$C_8H_6NO_4I$					
4	CH_3OCH_2	64-65	$C_9H_9NO_5$	1)	51.19	4.29	6.63	
				2)	51.55	4.19	6.89	
5	$Cl(CH_2)_2$	34-35[d]	$C_9H_8NO_4Cl$	1)	47.07	3.51	6.10	15.47
				2)	49.11	3.75	6.42	15.23
6	$C_6H_5CH_2$	81-82[e]	$C_{14}H_{11}NO_4$					
7	CH_3	76-77[f]	$C_8H_7NO_4$					
8	$(CH_3)_2CH$	38-39[g]	$C_{10}H_{11}NO_4$					
9	$(CH_3)_3C$	92.5-94[h]	$C_{11}H_{13}NO_4$					
10	$Cl(CH_2)_3$	63.5-64.5	$C_{10}H_{10}NO_4Cl$	1)	49.29	4.13	5.75	14.55
				2)	49.25	4.06	5.80	14.51
11	$Cl(CH_2)_4$	31-31.5	$C_{11}H_{12}NO_4Cl$	1)	51.27	4.69	5.43	13.77
				2)	51.54	4.57	5.53	13.82
12	$C_6H_5(CH_2)_2$	96-97[i]	$C_{15}H_{13}NO_4$					
13	$C_6H_5(CH_2)_3$	37	$C_{16}H_{15}NO_4$	1)	67.36	5.30	4.91	
				2)	67.10	5.17	5.01	
14	$C_6H_5(CH_2)_4$	62.5-63	$C_{17}H_{17}NO_4$	1)	68.21	5.72	4.68	
				2)	68.14	5.55	4.87	
15	$(C_6H_5NH)CH_2$	85-86.5[j]	$C_{16}H_{12}N_2O_4$	1)	64.86	4.08	9.45	
				2)	64.78	4.10	9.41	

TABLEAU I (suite)

16	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_2$	107-109.5[j,k]	$C_{17}H_{14}N_2O_4$	1) 65.80 4.55 9.03 2) 66.02 4.64 8.83
17	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_3$	99-101[j]	$C_{18}H_{16}N_2O_4$	1) 66.66 4.97 8.64 2) 66.44 4.96 8.37
18	$HCONHCH_2$	138-139[l]	$C_9H_8N_2O_5$	
19	$CH_3CONHCH_2$	126[m]	$C_{10}H_{10}N_2O_5$	
20	$CH_3CH_2CONHCH_2$	113-114	$C_{11}H_{12}N_2O_5$	1) 52.38 4.79 11.10 2) 52.17 4.79 11.01
21	$CH_3(CH_2)_2CONHCH_2$	116-122	$C_{12}H_{14}N_2O_5$	1) 54.13 5.30 10.55 2) 54.11 5.21 10.39
22	$C_6H_5CH_2OCONHCH_2$	125-127[n]	$C_{16}H_{14}N_2O_6$	
23	$CH_3CONH(CH_2)_3$	71.5-72.5[o]	$C_{12}H_{14}N_2O_5$	1) 54.13 5.30 10.52 2) 54.02 5.26 10.24

[a] m.p. 97° (Zahn et Schade, 1963). [b] m.p. 72-74° (Okawa et Hase, 1963).

[c] m.p. 76-77° (Lorand et coll., 1962). [d] Ce composé était pur à 92% d'après la quantité de p. nitrophénol libéré lors de l'hydrolyse totale dans la soude 0.1 M, d'un poids connu d'ester (mesure spectrophotométrique à 400 nm). Diverses autres préparations ont conduit à une huile qui se décomposait avec libération de chlore lors de la distillation sous pression réduite. [e] m.p. 62-63° (Tobias et coll., 1969).

[f] m.p. 80° (Hardman et coll., 1971). [g] m.p. 36.5-37° (Kreisley, 1957).

[h] m.p. 94-95° (Huggins et Lapides, 1947). [i] m.p. 97-98° (Mc Donald et Balls, 1957).

[j] cristaux jaunes. [k] m.p. 111-112° (Williams et Salvadori, 1971). [l] m.p. 139° (De Jersey et coll., 1969). [m] m.p. 126-128° (Ingles et Knowles, 1967).

[n] m.p. 128° (Farrington et coll., 1957). [o] Recristallisé à partir d'éther-éther de pétrole.

TABLEAU II

Propriétés générales des esters de paranitrophénol d'acides aminés protégés sur leur fonction α-aminée.[a]

N-acylamino acides	Points de Fusion (°C, non corrigés)	Formules brutes	Analyses élémentaires 1) % calculés 2) % trouvés C %	H %	N %	$[\alpha]_D^{24}$ c.2, N,N-di methylformamide
For-L-Ala.[b]	69 -71	$C_{10}H_{10}N_2O_5$	1) 50.42 2) 51.04	4.23 4.49	11.76 11.65	-31.2°
For-D-Ala.[c]	70-71	$C_{10}H_{10}N_2O_5$	1) 50.42 2) 50.44	4.23 4.29	11.76 11.88	+23.4° ± 1.2°
Z-L-Ala.[d]	76.5-78					-40.1° ± 0.4°
Z-D-Ala.	72 -73					+38° ± 3°
Z-L-Abu	59 -60	$C_{18}H_{18}N_2O_6$	1) 60.33 2) 60.62	5.06 5.06	7.82 7.82	-34.4° ± 0.1°
Z-D-Abu	56.5-59	$C_{18}H_{18}N_2O_6$	1) 60.33 2) 60.47	5.06 5.15	7.82 7.83	+35.5° ± 0.35°
Z-L-Val.[e]	61.5-63					-22.5° ± 1.3°
Z-D-Val.	63 -65					+26° ± 1°
Z-L-Nva.	68 -68.5	$C_{19}H_{20}N_2O_6$	1) 61.28 2) 61.20	5.41 5.48	7.52 7.60	-31.5° ± 0.0°
Z-D-Nva.	68.5-69.5	$C_{19}H_{20}N_2O_6$	1) 61.28 2) 61.39	5.41 5.30	7.52 7.77	+32.3° ± 2°.
Z-L-Leu.[f]	90.5-91.5					-34.25° ± 0.75°
Z-D-Leu.	90.5-91.5	$C_{20}H_{22}N_2O_6$	1) 62.16 2) 62.12	5.74 5.55	7.25 7.17	+32.8° ± 0.3°
Z-L-Nle[g]	68 -68.5	$C_{20}H_{22}N_2O_6$	1) 62.16 2) 62.30	5.74 5.81	7.25 7.21	-28° ± 0.5°
Z-L-Asn.[h]	147 -149.5					-36.6° ± 0.6°
Z-D-Asn.	148 -150	$C_{18}H_{17}N_3O_7$	1) 55.81 2) 55.60	4.42 4.44	10.84 10.62	+32.9° ± 0.8°
Z-L-Phe.[i]	123 -123.5					-24.4° ± 1.4°
Z-D-Phe.	120 -121.5					+22.85° ± 1.8°
Z-L-Trp.[j]	99 -103					- 3.7° ± 0.2°
N-α-Z-L-Lys.[k]	145 -148					-25.4° ± 0.9°

Légende du TABLEAU II.

[a] Les composés dont l'analyse élémentaire n'est pas donnée dans le Tableau II proviennent du commerce. [b] Ce composé était pur à 94 % d'après la quantité de p.nitrophénol libéré lors de l'hydrolyse totale d'un poids connu d'ester dans la soude 0.1 M (mesure spectrophotométrique à 400 nm.). [c] Pur à 98 %. [d] m.p. 79-79.5° ; $[\alpha]_D^{25}$ = - 38.1°(c1.4, acétate d'éthyle , (Goodman et Stueben, 1959). [e] m.p. 63° (Iselin et coll., 1957). [f] m.p. 95° ; $[\alpha]_D^{20}$ = - 33.5° (c 2, dimethylformamide) (Bodanszky et Du Vigneaud, 1959 a) [g] m.p. 70-71.5°, (Williams et coll., 1972). [h] m.p. 165-166° ; $[\alpha]_D^{20}$ = - 31.5° (c 2, dimethylformamide), (Bodanszky et Du Vigneaud, 1959 a). [i] m.p. 126-126.5° ; $[\alpha]_D^{20}$ = - 24.7° (c 2, dimethylformamide), (Bodanszky et Du Vigneaud, 1959 b). [j] m.p. 105° ; $[\alpha]_D^{25}$ = - 4.5° (c 5, dimethylformamide), (Wilchek et Patchornik, 1963) ; m.p. 102-103.5° ; $[\alpha]_D^{20}$ = - 4.1° (c 5, dimethylformamide), (Ingles et Knowles, 1967). [k] m.p. 151° , $[\alpha]_D$ = - 21.6° (c 2 , dimethylformamide) (Bender et Kezdy, 1965).

La plupart des esters de paranitrophénol décrits dans les Tableaux I et II ont été préparés selon la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide (BODANSZKY et du VIGNEAUD, 1959a ; BUZAS et coll., 1963) suivant le processus général décrit ci-dessous :

22 mM de dicyclohexylcarbodiimide (Fluka), dans le solvant de réaction, sont ajoutées à un mélange d'acide carboxylique ou d'acide aminé N-acylé (20 mM) et de paranitrophénol (22 mM) dans le tétrahydrofurane ou la diméthylformamide à 0°C. Le mélange est ensuite laissé pendant cinq heures à la température de la pièce. La dicyclohexylurée formée est alors filtrée, lavée, et le solvant évaporé sous vide. Le résidu solide (ou l'huile) obtenu est repris par l'acétate d'éthyle, la solution résultante est filtrée (élimination de l'excès de dicyclohexylurée), lavée quatre ou cinq fois par une solution à 10% de carbonate de sodium, puis par de l'eau distillée jusqu'à neutralité et mise à sécher sur SO_4Mg anhydre. L'acétate d'éthyle est alors évaporé sous vide et le résidu recristallisé deux fois ou plus dans l'éthanol absolu. En moyenne, les rendements en dicyclohexylurée étaient de l'ordre de 80% et ceux en esters d'environ 40% après la première cristallisation. Nous n'avons pas recherché une amélioration de ces rendements.

Les esters paranitrophényliques de la formyl-D-alanine et de la formyl-L-alanine, préparés également à partir de la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide, avec de mauvais rendements, ont été difficilement recristallisés dans un mélange chloroforme-hexane.

Certains composés ont dû être préparés selon des processus de synthèse différents.

Méthoxyacétate de paranitrophénol. Obtenu par action du chlorure d'acide sur le paranitrophénol suivant la méthode décrite par FIFE (1965) ; 20 mM du chlorure de l'acide méthoxyacétique (produit Aldrich) sont ajoutées lentement à une solution de paranitrophénol dans l'éther anhydre, en présence d'un équivalent de pyridine. L'ester est obtenu avec un rendement de 33%. Le solvant de cristallisation est l'éther éthylique.

Ester paranitrophénylique de la N-α-benzyloxycarbonyl-D-asparagine. Cet ester a été synthétisé selon la méthode décrite pour la préparation du T.butyloxycarbonyl-asparaginate de paranitrophénol (STEWART et YOUNG, 1969) ; 4 mM de Carbobenzoxy-D-asparagine (produit K and K) sont mises à réagir avec le paranitrophénol en excès de quatre fois, en présence de 4,4 mM de dicyclohexylcarbodiimide dans la diméthylformamide. L'ester est obtenu avec un rendement de 50%. Le solvant de cristallisation est l'éthanol.

Les différentes constantes physico-chimiques des substrats sont reportées dans les Tableaux I et II. Les points de fusion ne sont pas corrigés. Ils ont été mesurés sur un appareil Büchi.

Les analyses élémentaires ont été effectuées au Laboratoire Central de Microanalyse de Gif-sur-Yvette.

TABLEAU III

Valeurs expérimentales des pK_a des acides aminés N-acylés.[a]

N-acylamino acides	pK_a [b]
Z-Gly	3,70 ± 0,02
Z-Ala	3,67 ± 0,07
Z-Abu	3,83 ± 0,12
Z-Nva	3,81 ± 0,01
7-Asn	3,56 ± 0,01
Z-Phe	3,69 ± 0,2
Z-Val	3,92 [c]
Z-Leu	3,86 [c]
For-Ala	3,50 ± 0,05

[a] Conditions expérimentales : T = 25°C ; la mesure des pKa est effectuée en NaCl 0,1; 0,05 et 0,01. Les valeurs des pKa données dans le Tableau sont extrapolées à force ionique nulle. [b] Nous avons supposé identiques les valeurs des pK_a pour les stéréoisomères. [c] Valeurs des pK_a données par Khurgin et Dmitrieva (1965), corrigées de l'effet de solvant ; un déplacement moyen de 0,56 unité pH est observé entre les déterminations des pK_a faites par ces auteurs dans un mélange dioxane-eau (1:4 V/V) et nos mesures faites dans l'eau pour la Z-Gly, la Z-Ala et la Z-Phe.

Le degré de pureté des esters était au moins de 98% d'après la quantité de paranitrophénol libéré lors de leur hydrolyse totale alcaline ou enzymatique, à l'exception de certains d'entre eux comme il est spécifié dans les Tableaux I et II.

MESURES DES POUVOIRS ROTATOIRES

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à la température ambiante à l'aide d'un polarimètre Quick Roussel-Jouan (cf Tableau II).

MESURES DES pK DE CERTAINS ACIDES AMINES N-α-ACYLES

Les valeurs des pK de certains acides aminés N-α-acylés ont été déterminées potentiométriquement à l'aide d'un pH mètre Vibron modèle 33 B (Electronic Instruments Ltd.) équipé d'une électrode de verre GFH 33. Les titrages ont été effectués en solution aqueuse à différentes forces ioniques (μ = 0,1 - 0,05 - 0,01 en NaCl). Le dérivé d'acide aminé, à la concentration de 5.10^{-3} M, étant neutralisé par de la soude 2N, est titré en retour par de l'acide chlorhydrique 1N (titrisol Merck), à 25°± 0,1°. Les valeurs des pK obtenues sont reportées dans le Tableau III.

MESURES CINETIQUES

Tout au long de cette étude, nous avons utilisé un seul lot d'α-chymotrypsine, en provenance de la Worthington Biochemical Corp. ; lot n° CDI 61378, trois fois cristallisé, sans sel.

La concentration moléculaire de l'enzyme en solution d'acide chlorhydrique 10^{-3} M est mesurée à 280 nm en prenant le coefficient d'extinction molaire égal à 5.10^4 (DIXON et NEURATH, 1957) et un poids moléculaire de $2,5\ 10^4$ (WILCOX et coll., 1957). La concentration en sites actifs est obtenue par mesure du jet de paranitrophénol en utilisant comme substrat le paranitrophénylacétate (BENDER et coll., 1966). En moyenne, le pourcentage de sites actifs était de 92-94. Les mesures cinétiques ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 16, couplé à un enregistreur Sefram Graphispot.

Les vitesses d'hydrolyse chymotrypsique des esters ont été mesurées en suivant l'apparition de l'ion paranitrophénol à 400 nm. A 400 nm, seule la forme déprotonée du paranitrophénol absorbe. Dans nos conditions expérimentales, la valeur optimum du coefficient d'extinction molaire de l'ion paranitrophénol a été trouvée égale à 18300 (25° ; soude 0,1 M ; 4,5 % v/v acétonitrile-eau), le pK_a étant déterminé à 7,03. Nous avons utilisé ces deux valeurs pour calculer les coefficients d'extinction molaire du paranitrophénol en fonction du pH. Dans tous les cas où la vitesse d'hydrolyse spontanée des substrats atteignait une valeur $\geqslant 1\%$ de la vitesse d'hydrolyse enzymatique, les corrections appropriées ont été faites. Les mesures cinétiques ont été menées à 25°± 0,1°, entre pH 6 et 8. Le pH était maintenu constant à l'aide de tampons non nucléophiles à la concentration 0,025 M ; nous avons respectivement utilisé de pH 6 à 7, le tampon MES-NaOH ou acide 2-(N-morpholino) éthane-sulfonique -NaOH, et de pH 7 à 8, le tampon

HEPES-NaOH ou acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthane-sulfonique-NaOH (GOOD et coll., 1966), (produits de la Calbiochem. Chem. Comp.). La concentration saline a été maintenue constante et égale à 0,5 M en NaCl pour une solution contenant par ailleurs 4,5 % en volume d'acétonitrile traité et distillé (COETZEE, 1967). Le contrôle du pH a été effectué, avant et après réaction, au moyen d'un pH mètre Tacussel, type TS 60/N.

Dans une mesure cinétique type, nous laissions incuber dans la cuve thermostatée du Cary 16, un mélange de 2,5 ml de tampon au pH voulu, 50 µl de la solution d'enzyme dans HCl 10^{-3}M et 70 µl de CH_3CN. Après cinq minutes d'incubation, 50 µl de la solution de substrat dans CH_3CN étaient alors ajoutés et l'apparition de paranitrophénol enregistrée. La vitesse d'hydrolyse spontanée du substrat était déterminée selon le même processus en substituant 50 µl d'acide chlorhydrique 10^{-3} M aux 50 µl de la solution enzymatique. Les esters paranitrophényliques des acides aminés N-α-benzyloxycarbonylés sont relativement stables en solution aqueuse à pH neutre quand on les compare avec d'autres esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-acylés dont l'hydrolyse se fait par l'intermédiaire d'une oxazolinone (De JERSEY et coll., 1969). Dans la gamme de pH 6-8, les vitesses de leur hydrolyse spontanée ne dépassent pas 5 à 10% de la vitesse d'hydrolyse enzymatique. Cependant, quelques-uns d'entre eux sont plus instables dans l'eau ; ainsi les vitesses d'hydrolyse spontanée des N-α-Z-L (ou D)-asparagine-ONp et du N-α-Z-L-lysine-ONp représentent au moins 15 à 30% de la vitesse d'hydrolyse enzymatique à pH 7,2.

L'hydrolyse spontanée de l'ester paranitrophénylique de la N-α-benzyloxycarbonyl-L-asparagine implique la formation d'une imide intermédiaire (BERNHARD et coll., 1962). En effet, le titrage potentiométrique des produits de la réaction indique que ces produits sont des acides faibles dont les valeurs des pK_a sont respectivement égales à $pK_a \simeq 7,7$ pour le paranitrophénol et $pK_a \simeq 9,5$ pour la benzyloxycarbonyl-L-aminosuccinimide, dans un mélange dioxane-eau (2:3 v/v). Par contre, l'hydrolyse par l'α-chymotrypsine de cet ester conduit à la formation de paranitrophénol ($pK_a \simeq 7,7$) et de N-α-benzyloxycarbonyl-L-asparagine ($pK_a \simeq 4,2$) ainsi que le montrent les titrages potentiométriques des produits de la réaction enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

- BENDER, M.L., et KEZDY, F.J. (1965) Annu. Rev. Biochem. 34, 49

- BENDER, M.L., BEGUE-CANTON, M.L., BALKELEY, R.L., BRUBACHER, L.J., FEDER, J., GUNTER, C.R., KEZDY, F.J., KILLHEFER, J.V. Jr., MARSHALL, T.H., MILLER, C.G., ROESKE, R.W. et STOOPS, J.K. (1966) J. Amer. Chem. Soc. 88, 5890

- BERGMANN, M., et ZERVAS, L. (1932) Ber. 65, 1192

- BERNHARD, S.A., BERGER, A., CARTER, J.H., KATCHALSKI, E., SELA, M., et SHALITIN, Y. (1962) J. Amer. Chem. Soc. 84, 2421

- BODANSZKY, M., et du VIGNEAUD, V., (1959a) J. Amer. Chem. Soc. 81, 5688

- BODANSZKY, M., et du VIGNEAUD, V., (1959b) J. Amer. Chem. Soc. 81, 6072

- BONDI, S., et EISSLER, F., (1910) Biochem. Z. 23, 499

- BUZAS, A., EGNELL, C., et FREON, P., (1963) Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 256, 1804

- COETZEE, J.F. (1967) Progr. Phys. Org. Chem. 4, 1049

- De JERSEY, J., WILLADSEN, P., et ZERNER, B., (1969) Biochemistry 8, 1959

- DIXON, G.H., et NEURATH, H., (1957) J. Biol. Chem. 225, 1049

- FARRINGTON, J.A., HEXTALL, P.J., KENNER, G.W., et TURNER, J.M. (1957) J. Chem. Soc. 1407

- FIESER, L.F., (1955) in Experiments in Organic Chemistry, 3ème edition, Heath, D.C., and Co, Ed., Boston, p. 281

- FIFE, T.H., (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87, 4597

- GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., CONNOLY, T.N., IZAWA, S., SINGH, R.M.M., (1966) Biochemistry 5, 467

- GOODMAN, M., et STUEBEN, K.C., (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 3980

- HARDMAN, M.J., VALENZUELA, P., et BENDER, M.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5907

- HUGGINS, C., et LAPIDES, J. (1947) J. Biol. Chem. 170, 467

- INGLES, D.W., et KNOWLES, J.R., (1967) Biochem. J. 104, 369

- ISELIN, B., RITTEL, W., SIEBER, P., et SCHWYZER, R., (1957) Helv. Chim. Acta 40, 373

- KHURGIN, Y. I., DMITRIEVA, M.G. (1965) Tetrahedron 21, 2305

- KREISLEY, S., (1957) Acta Chem. Scand. 11, 913

- LEFRANCIER, P., et BRICAS, E., (1965) Bull. Soc. Chim. France 3668

- LORAND, L., BRANNEN, W.T. Jr., et RULE, N.G., (1962) Arch. Biochem. Biophys. 96, 147

- McDONALD, C.E., et BALLS, A.K., (1957) J. Biol. Chem. 227, 727

- OKAWA, K., et HASE, S., (1963) Bull. Soc. Chim. Japan 36, 754

- SHEEHAN, J.C., et YANG, D-D.H., (1958) J. Amer. Chem. Soc. 80, 1154 (

- STEWART, J.M., et YOUNG, J.D., (1969) in "Solid Phase Peptide Synthesis", Freeman, W.H. and Co, Ed. San Francisco, p. 30

- TOBIAS, P., HEIDEMA, J.H., LO, K.W., KAISER, E.T., et KEZDY, F.J., (1969) J. Amer. Chem. Soc. 91, 202

- WILCHEK, M., et PATCHORNIK, A., (1963) J. Org. Chem. 28, 1874

- WILCOX, P.E., KRAUT, J. WADE, R.D., et NEURATH, H., (1957) Biochim. Biophys. Acata 24, 72

- WILLIAMS, A., et SALVADORI, G., (1971) J. Chem. Soc. (B) 2401

- WILLIAMS, A., LUCAS, E.C., RIMMER, A.R., et HAWKINS, H.C., (1972) J. Chem. Soc., Perkin II, 627

- ZAHN, H., et SCHADE, F., (1963) Chem. Ber. 96, 1747

R E S U L T A T S et D I S C U S S I O N

RESULTATS et DISCUSSION

- Généralités
  - Notions d'efficacité et de spécificité enzymatique
  - Cinétique formelle
  - Estimation des constantes polaires et stériques des substituants
- Hydrolyse chymotrypsique des esters de paranitrophénol d'acides carboxyliques simples
  - Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques :
    - Effets des substituants sur la constante de désacylation k_3
    - Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre, k_{cat}/K_m
    - Effets des substituants sur le pK''_1
  - Discussion
    - Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation
    - Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation
    - Comparaison de l'hydrolyse enzymatique d'esters méthyliques et d'esters paranitrophényliques
- Hydrolyse chymotrypsique des esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-acylés
  - Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques :
    - Effets des substituants sur la constante de désacylation k_3

- Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m
- Effets des substituants sur le pK''_1

. Discussion

- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation
- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation

- Bibliographie

Les enzymes sont caractérisés par deux propriétés fondamentales : leur efficacité et leur spécificité.

- Efficacité de la catalyse enzymatique

A priori, il n'est pas aisé de comparer l'efficacité de l'enzyme vis-à-vis d'une réaction modèle, les processus intimes impliqués dans l'acte catalytique de la réaction modèle et de la réaction enzymatique n'étant pas les mêmes.

Globalement, l'action de l'eau, assistée par un nucléophile Nu, sur un substrat du type R-CO-X peut s'écrire :

$$R\text{-}CO\text{-}X + Nu \xrightarrow{k_2} R\text{-}CO\text{-}Nu + X^- \xrightarrow{H_2O} R\text{-}CO\text{-}O^- + Nu$$

Schéma 1

Dans le Tableau IV, nous avons comparé les efficacités relatives de différents nucléophiles vis-à-vis de l'acétate de paranitrophénol et du N- α-benzyloxycarbonyl-L-phénylalaninate de paranitrophénol. Il est évident qu'à pH neutre, l'α-chymotrypsine hydrolyse l'acétate de paranitrophénol mieux que tout autre nucléophile. Les raisons de cette efficacité particulière de l'enzyme vis-à-vis de substrats non spécifiques ne sont pas claires. Alors que le pK_a de l'ion hydroxyle est de 15,75 (JOHNSON, 1967), l'hydroxyle de la sérine active de l'α-chymotrypsine a un pK_a apparent de 7, de telle sorte que l'enzyme devrait être moins réactif que l'ion OH^- et par conséquent plus sélectif. En fait, le nucléophile de la chymotrypsine est un système composite dont la demi-protonation s'opère à pH ≃ 7. (BLOW et coll., 1969).

Pour expliquer les différences de réactivité observées lors d'une réaction enzymatique et d'une réaction modèle, BENDER et coll. (1964b) ; KOSHLAND et NEET (1968) ont suggéré diverses hypothèses. Pour BENDER et coll., cinq facteurs peuvent rendre compte cinétiquement et thermodynamiquement des différences observées entre les vitesses d'hydrolyse de l'amide du N-acétyl-L-tryptophane catalysée par l'α-chymotrypsine d'une part et par la soude d'autre part. Ces cinq facteurs sont respectivement :

- la conversion de la catalyse basique en une catalyse générale basique par l'imidazole dans le cas de l'enzyme ;
- le caractère intramoléculaire du processus enzymatique qui aurait pour conséquence l'augmentation de la concentration effective des groupes catalytiques ;
- le changement dans l'étape limitante de la réaction ;
- la rigidification du substrat par l'enzyme dans une conformation proche de celle de l'état de transition ;
- la catalyse générale acide par l'imidazole.

La concordance entre la constante de vitesse mesurée expérimentalement et la constante de vitesse calculée pour l'hydrolyse α-chymotrypsique de l'amide du N-acétyl-L-tryptophane est remarquable (≃ 10%) et cette concordance est d'autant plus remarquable que chacun des facteurs invoqués est obtenu indirectement sans possibilité de vérifications expérimentales!...
De leur côté, KOSHLAND et NEET (1968) reconnaissent que pour expliquer l'énorme pouvoir catalytique des enzymes il faut se tourner vers les hypothèses les plus spéculatives comme les

TABLEAU IV

Réactivités comparées de l'α-chymotrypsine et de divers agents nucléophiles.[a]

	N P A		Z - L - Phe - ONp	
Nucléophiles	k_2 LM^{-1} sec^{-1}	$k_2 / k_{2,0}$	$k_2 LM^{-1} sec^{-1}$	$k_2 / k_{2,0}$
α-chymotrypsine	2.5×10^{3} [b]	1	7.5×10^{7} [b]	1
isonitroseacétone	13 [c]	5.2×10^{-3}		
hydroxylamine	1.8 [c]	7.2×10^{-4}		
imidazole	0.34 [d]	1.35×10^{-4}	0.55 [b]	7.3×10^{-9} [b]
glycylglycine	6×10^{-2} [e]	2.4×10^{-5}	3×10^{-2}	4×10^{-10}
OH^-	1.4×10^{-5} [b]	5.6×10^{-9}	9.2×10^{-5} [b]	1.2×10^{-12} [b]

[a] pH 8, 25°. [b] Valeurs déterminées au laboratoire. [c] Jencks et Carriuolo, 1960.

[d] Bruice et Schmir, 1958. [e] Koltun et Gurd, 1959. [f] Khurgin et Dmitrieva, 1965.

facteurs d'orientation, de contrainte, d'environnement microscopique..., autant de facteurs que nous ne savons pas quantifier à l'heure actuelle. En vérité, même dans le cas de l'α-chymotrypsine, considéré comme un système trop simple pour certains, une des clés de la catalyse enzymatique reste à trouver.

L'examen du Tableau IV fait ressortir le deuxième trait essentiel de l'acte catalytique : l'efficacité de l'enzyme est plus grande vis-à-vis d'un substrat comme l'ester paranitrophénylique de la Z-L-phénylalanine. Nous voyons ainsi se manifester la spécificité de la catalyse enzymatique. Avant d'aborder l'analyse de cette spécificité, peut-être serait-il utile de fixer le cadre dans lequel cette dernière doit être considérée ; c'est-à-dire quelles sont les constantes cinétiques significatives pour établir des relations entre structure et réactivité.

- Schéma réactionnel et paramètres cinétiques à considérer

Au pH optimum de la réaction, l'action de la chymotrypsine E sur un substrat du type R-CO-X peut s'écrire selon le schéma 2 :

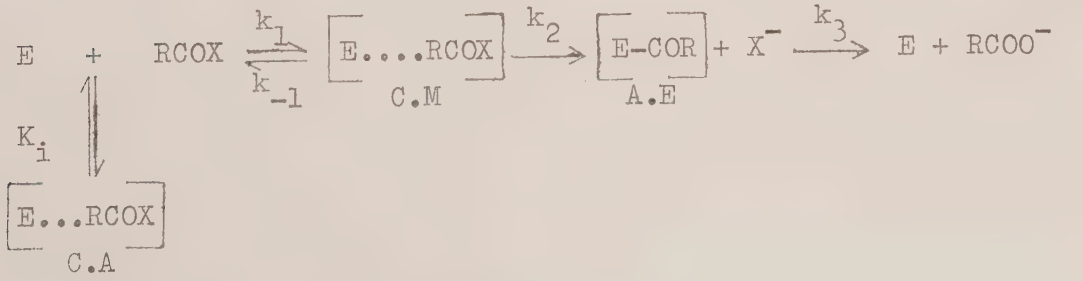


Schéma 2

dans lequel E représente l'enzyme, C.A un complexe abortif, C.M le complexe de Michaëlis et A.E l'acyl-enzyme. X^- et $RCOO^-$ sont les produits de la réaction. K_i et K_s sont respectivement les constantes de dissociation du complexe abortif (C.A) et du complexe de Michaëlis (C.M). La résolution du schéma 2 à l'état stationnaire conduit à l'expression générale de la vitesse de la réaction v égale à :

$$v = \frac{\dfrac{k_2}{1 + K_s/K_i + k_2/k_3}}{S_o + \dfrac{K_s}{1 + K_s/K_i + k_2/k_3}} E_o S_o = \frac{k_{cat}}{S_o + K_m} E_o S_o \quad (7)$$

Dans le cas général, où aucune hypothèse simplificatrice ne peut être faite quant à l'étape limitante de la réaction, la constante de vitesse de la réaction

$$k_{cat} = \frac{k_2}{1 + K_s/K_i + k_2/k_3} \quad (8)$$

et la constante de Michaëlis apparente

$$K_m = \frac{K_s}{1 + K_s/K_i + k_2/k_3} \quad (9)$$

sont des combinaisons complexes de divers paramètres. Il sera alors impossible d'affecter les variations globales observées à tel ou tel paramètre. Par contre, le rapport k_{cat}/K_m étant toujours égal à k_2/K_s, il pourra être utilisé dans les relations structure-réactivité, bien qu'une certaine ambiguïté subsistera pour déterminer si les variations portent sur k_2 ou K_s.

. Hypothèse simplificatrice :

Dans le cas des esters de paranitrophénol, pour lesquels $k_2 \gg k_3$, l'étape limitante de la réaction est l'étape de désacylation (ZERNER et BENDER, 1964 ; INGLES et KNOWLES, 1967). La constante de vitesse de la réaction $k_{cat} = k_3$ (équation 10) devient donc un paramètre cinétique significatif car il n'est pas affecté par des fixations multiples si l'on suppose $K_i \simeq K_s$. Par contre, le K_m apparent demeure un paramètre ambigu. En effet, nous avons $K_m = \frac{k_3}{k_2} K_s$ (équation 11) combinaison non linéaire de trois paramètres susceptibles de répondre différemment lors de la recherche de L.F.E.R. Donc, dans le cas qui nous intéresse, c'est-à-dire celui de substrats à désacylation limitante, seuls les paramètres k_3 et k_{cat}/K_m peuvent être utilisés.

. Formulation des équations en fonction du pH :

Entre pH 6 et 8, zone dans laquelle l'histidine 57 du site actif s'ionise, le mécanisme d'hydrolyse chymotrypsique est représenté par le schéma 3 (BENDER et coll., 1964a) :

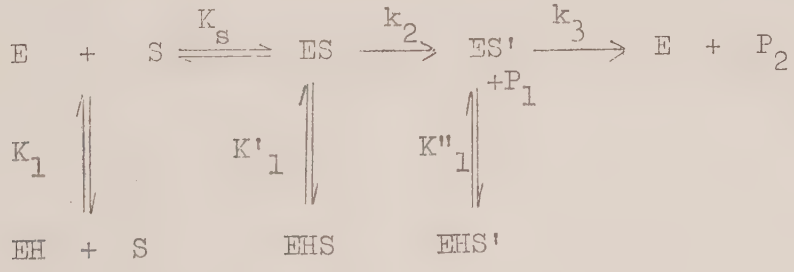


Schéma 3

S représente le substrat ; E et EH les formes actives et inactives de l'enzyme ; ES et EHS les complexes de Michaëlis correspondants ; ES' et EHS', les différentes formes de l'acyl-enzyme. Les produits de la réaction P_1 et P_2 sont respectivement le paranitrophénol et l'acide carboxylique ou l'acide aminé.

A l'état stationnaire, dans les conditions où $S_o \gg E_o$, la vitesse d'apparition du produit P_1 est donnée par l'équation 12 :

$$dP_1/dt = \frac{k_{cat}}{S_o + K_m} E_o S_o \qquad (12)$$

équation dans laquelle $k_{cat} = \dfrac{k_2 k_3}{k_2(1 + H/K''_1) + k_3(1 + H/K'_1)}$ (13)

et $K_m = K_s \dfrac{k_3(1 + H/K_1)}{k_2(1 + H/K''_1) + k_3(1 + H/K'_1)}$ (14)

L'hypothèse $k_2 \gg k_3$ conduit aux expressions simplifiées

$$k_{cat} = \frac{k_3}{1 + H/K''_1} \qquad (15)$$

et $$K_m = K_s \frac{k_3(1 + H/K_1)}{k_2(1 + H/K''_1)} \qquad (16)$$

De plus, dans la zone de pH 6 à 8, nous pouvons considérer que la constante de Michaëlis apparente ne varie pas (BENDER et coll., 1964a ; Mc CONN et coll., 1971) et demeure égale à

$$K_m = K_s \; k_3/k_2 \qquad (17)$$

- Estimation des constantes polaires, σ^*, et stériques, E_s, des substituants

Pour certains composés étudiés, nous disposions des Tables de TAFT (1956) donnant les valeurs des constantes polaires, σ^*, et stériques, E_s, des substituants. Toutefois, pour la majorité d'entre eux, nous avons dû estimer les valeurs de σ^* et E_s. Nous ne donnons ici que les méthodes générales utilisées pour le calcul des différentes constantes σ^* et E_s, chaque cas particulier étant précisé par ailleurs au moment de l'emploi de ces constantes.

- Estimation des constantes polaires des substituants

Nous avons utilisé deux méthodes. La première, basée sur la règle d'additivité des σ^* (TAFT, 1956), a été utilisée lorsque le substituant R était composé de différents groupes dont les σ^* étaient connus.

La seconde méthode est une extrapolation de la démarche de CHARTON. CHARTON (1964) définit une relation entre la constante traduisant l'effet inductif d'un substituant x, $\sigma_{i,x}$ et le pK de l'acide carboxylique correspondant, noté $pK_{a,x}$

$$\sigma_{i,x} = b\,(pK_{a,x}) + d \qquad (18)$$

TABLEAU V

Valeurs de σ_i et de σ^* utilisées pour le calcul de la corrélation $\sigma^* = 2{,}22\ \sigma_i$

Composés	σ_i [a]	σ^* [b]	σ^* [d]
NH_2CH_2	0.58	1.30	1.288
FCH_2	0.52	1.10	1.155
$ClCH_2$	0.47	1.05	1.044
$BrCH_2$	0.45	1.00	0.999
$F_3C\text{-}CH_2$	0.42	0.92	0.933
ICH_2	0.39	0.85	0.866
CH_3OCH_2	0.25	0.64[c]	0.555
$HOCH_2$	0.25	0.555	0.555
$Cl(CH_2)_2$	0.15	0.385	0.333
$C_6H_5CH_2$	0.10	0.215	0.222
$C_2H_5(CH_2)_2$	0.04	0.08	0.089
CH_3	0.00	0.00	0.00
$C_6H_5(CH_2)_3$	-0.01	0.02	-0.022
C_2H_5	-0.05	-0.10	-0.111
iC_4H_9	-0.03	-0.125	-0.0666
nC_3H_7	-0.05	-0.115	-0.111
nC_4H_9	-0.03	-0.130	-0.0666
$tC_4H_9CH_2$	-0.07	-0.165	-0.155

[a] Valeurs de σ_i d'après Charton (1964). [b] Valeurs de σ^* d'après Taft, (1956).

[c] Valeurs de σ^* d'après Ballinger et Long, (1960). [d] Valeurs de σ^* calculées selon l'équation $\sigma^* = 2{,}22\ \sigma_i$.

Les paramètres b et d de la corrélation sont fonction de la température ; à 25°, b = - 0,2512 et d = 1.186. A partir de valeurs connues de $\sigma_{i,x}$ et σ^* (cf Tableau V), nous avons recherché une relation linéaire entre ces deux types de constantes, soit

$$\sigma^* = (2,22 \pm 0,03) \quad \sigma_i \text{ ; avec n = 18 composés ; r = 0,997 (19)}$$

Ainsi, la mesure des pK des acides et l'utilisation de l'équation 19 peut nous permettre de calculer différents σ^*.

D'une façon générale, le coefficient de corrélation r précise le degré de linéarité de la corrélation établie. C'est en quelque sorte une mesure de la confiance que l'on peut porter à la droite de corrélation. JAFFE (1953) discute de la signification à donner au coefficient de corrélation r. Ainsi, pour $0,99 \leqslant r \leqslant 1$, la corrélation est excellente ; pour $r > 0,95$, la corrélation est considérée comme satisfaisante tandis qu'elle est assez bonne pour $r > 0,9$ et mauvaise pour $r < 0,9$. Toutefois, l'auteur insiste sur le caractère relatif à donner au coefficient de corrélation r et fait remarquer que n, le nombre de points obéissant à la corrélation, doit entrer également en considération.

- Estimation des constantes stériques des substituants

Nous avons également utilisé deux méthodes. La première repose sur les analogies de structure entre substituants dont la valeur de E_s est connue (TAFT, 1956) pour l'un d'entre eux. Nous extrapolons alors directement les valeurs de E_s pour les autres substituants.

TABLEAU VI

Calcul des constantes stériques E_s des substituants selon l'équation

$$E_{s,\ R_1R_2CH} = 2{,}54\ (E_{s,R_1CH_2} + E_{s,R_2CH_2})$$

Substituants	$E_{s,R_1CH_2} + E_{s,R_2CH_2}$	a	b	c
		$E_{s,\ R_1R_2CH}$	$E_{s,\ R_1R_2CH}$	$E_{s,\ R_1R_2CH}$
$(CH_3)_2CH$	- 0.14	- 0.47		- 0.35
$(C_2H_5)_2CH$	- 0.72	- 1.98		- 1.83
Br_2CH	- 0.54	- 1.86		- 1.37
Cl_2CH	- 0.48	- 1.54		- 1.22
F_2CH	- 0.48	- 0.67		- 1.22
$CH_3CH(CH_3)CH_2$	- 0.43	- 1.13		- 1.09
$C_6H_5CH(CH_3)CH_3$	- 0.45	- 1.19		- 1.14
$C_6H_5CH(C_2H_5)CH_3$	- 0.74	- 1.50		- 1.88
$n(C_3H_7)_2CH$	- 0.78	- 2.11		- 1.98
$(C_6H_5)_2CH$	- 0.76	- 1.76		- 1.93

[a] Somme des constantes stériques des substituants pour chaque substituant R_1CH_2 et R_2CH_2. Ces constantes sont données par Taft (1956). [b] Les constantes stériques des substituants pour les composés disubstitués R_1R_2CH sont données par Taft (1956). [c] Valeurs calculées en utilisant l'équation :

$$E_{s,\ R_1R_2CH} = 2{,}54\ (E_{s,R_1CH_2} + E_{s,R_2CH_2})$$

La seconde méthode consiste à utiliser la corrélation établie de la façon suivante. A partir des valeurs connues de E_s pour des composés bisubstitués sur le carbone α (TAFT, 1956) du type $\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}\!\!>\!CH$, nous avons recherché la corrélation entre E_{s,R_1R_2CH} d'une part et $E_{s,R_1CH_2} + E_{s,R_2CH_2}$ d'autre part. Pour dix composés (cf Tableau VI), la relation établie est de la forme :

$$E_{s,R_1R_2CH} = \boxed{2,54 \pm 0,17}\ E_{s,R_1CH_2} + E_{s,R_1CH_2} \qquad (20)$$

avec n = 10 composés ; r = 0,831

Ce n'est pas là évidemment une bonne corrélation, tout au plus une approximation. Néanmoins, nous avons utilisé l'équation 20 pour estimer les valeurs des constantes stériques des dérivés d'acides aminés tout en considérant de fortes déviations standards pour ces dernières valeurs de façon à être certain d'encadrer les valeurs réelles des E_s.

Légende du TABLEAU VII.

[a] Conditions expérimentales : température, 25° ; 0,5 M NaCl ; 4,5 % (v/v) acétonitrile-eau. Les valeurs de K_m ont été obtenues à partir des mesures des vitesses d'hydrolyse à un pH constant égal à 7,56. pK''_1 et k_3 ont été obtenues par la mesure des vitesses d'hydrolyse à différents pH et pour une concentration donnée de substrat ($S > K_m$). En supposant que la valeur de K_m était indépendante du pH, constante de vitesse de désacylation k_3 a été corrigée du K_m. Les données expérimentales ont été traitées par une calculatrice Wang 373.

[b] Ces valeurs de K_m ont été obtenues par hydrolyse enzymatique totale.

TABLEAU VII

Constantes cinétiques déterminées lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters de paranitrophénol d'acides carboxyliques $RCOOC_6H_4p\text{-}NO_2$.[a]

	R	pK''_1	K_m ($M \times 10^6$)	k_3 ($sec^{-1} \times 10^2$)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}sec^{-1} \times 10^{-4}$)
1	$ClCH_2$	6.90±.04	5.16±.28	295 ± 4	57.1 ± 2.6
2	H	7.60±.09	12.5 ±1.0	243 ± 85	19.4 ± 6.8
3	ICH_2	6.95±.05	5.82±.35	79.0 ± 6.5	13.6 ± 1.1
4	CH_3OCH_2	7.16±.02	3.06±.15	35.0 ± 4.8	11.4 ± 1.6
5	$Cl(CH_2)_2$	7.13±.01	2.39±.20	2.16 ± .16	.904 ± .07
6	$C_6H_5CH_2$[b]	7.41±.02	.394±.079	2.23 ± .33	5.6 ± .8
7	CH_3	7.40±.01	3.46±.64	.996 ± .015	.288 ± .004
8	$(CH_3)_2CH$	7.34±.02	2.12±.15	.357 ± .018	.168 ± .008
9	$(CH_3)_3C$	7.04±.02	1.8 ± .9	.0205± .002	.0114± .001
10	$Cl(CH_2)_3$	7.33±.02	3.57±.16	5.35 ± .10	1.50 ± .03
11	$Cl(CH_2)_4$	7.41±.06	3.03±.24	4.26 ± .26	1.40 ± .09
12	$C_6H_5(CH_2)_2$[b]	7.26±.02	.37 ±.02	18.60± .77	50 ± 2
13	$C_6H_5(CH_2)_3$[b]	7.33±.05	.99 ±.013	13.4 ± 1.4	13.5 ± 1.4
14	$C_6H_5(CH_2)_4$	7.73±.05	2.79±.02	2.07± .16	.74 ± .06
15	$\beta(C_8H_6N)CH_2$	7.55±.04	<.1	.304 ± .014	> 3
16	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_2$[b]	7.40±.02	.30 ±.05	33.6 ± .8	112 ± 3
17	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_3$[b]	7.64±.02	.80 ±.03	14.9 ± 3.6	18.6 ± 4.5
18	$HCONHCH_2$	6.95±.03	15.7±.8	24.5 ± 2.9	1.56 ± .18
19	$CH_3CONHCH_2$	6.87±.01	138 ±11	75.2 ± 2.3	.54 ± .02
20	$CH_3CH_2CONHCH_2$	6.99±.015	113 ± 9	55.95± 3.3	.495 ± .03
21	$CH_3(CH_2)_2CONHCH_2$	6.94±.015	136 ± 22	87.1 ± 6.2	.64 ± .045
22	$C_6H_5CH_2OCONHCH_2$	7.01±.03	4.9 ±.5	41.1 ± 2.0	8.38 ± .40
23	$CH_3CONH(CH_2)_3$	7.30±.05	< 1	.62 ± .05	> .6

- Hydrolyse chymotrypsique des esters de paranitrophénol d'acides carboxyliques simples

. Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters paranitrophénylyliques d'acides carboxyliques.

Les valeurs expérimentales des constantes k_3, K_1'' et K_m obtenues lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters paranitrophénylyliques d'acides carboxyliques à groupes acyles variables ($RCOOC_6H_4p.NO_2$) sont données dans le Tableau VII.

La relation de TAFT-INGOLD (Equation 3) a été utilisée pour évaluer les différents effets du substituant R sur la constante de désacylation k_3 et la constante d'acylation du second ordre $k_{cat}/K_m = k_2/K_s$ définie par ZERNER et BENDER (1964), BROT et BENDER (1969). La constante de vitesse d'acylation obtenue expérimentalement est une constante du second ordre. Les mauvaises solubilités des substrats et les valeurs élevées des K_s, constantes de dissociation enzyme-substrat, ne permettent pas d'atteindre k_2.

- Effets des substituants sur la constante de vitesse de désacylation k_3

La meilleure droite de corrélation obéissant à l'équation de TAFT-INGOLD pour le plus grand nombre possible de composés a été trouvée égale à :

TABLEAU VIII

Constantes de spécificité de désacylation, S_d, et d'acylation, S_a, obtenues lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters paranitrophénoliques d'acides carboxyliques, $RCOOC_6H_4p\text{-}NO_2$.
Constantes polaires, stériques et "hydrophobes" des substituants R.

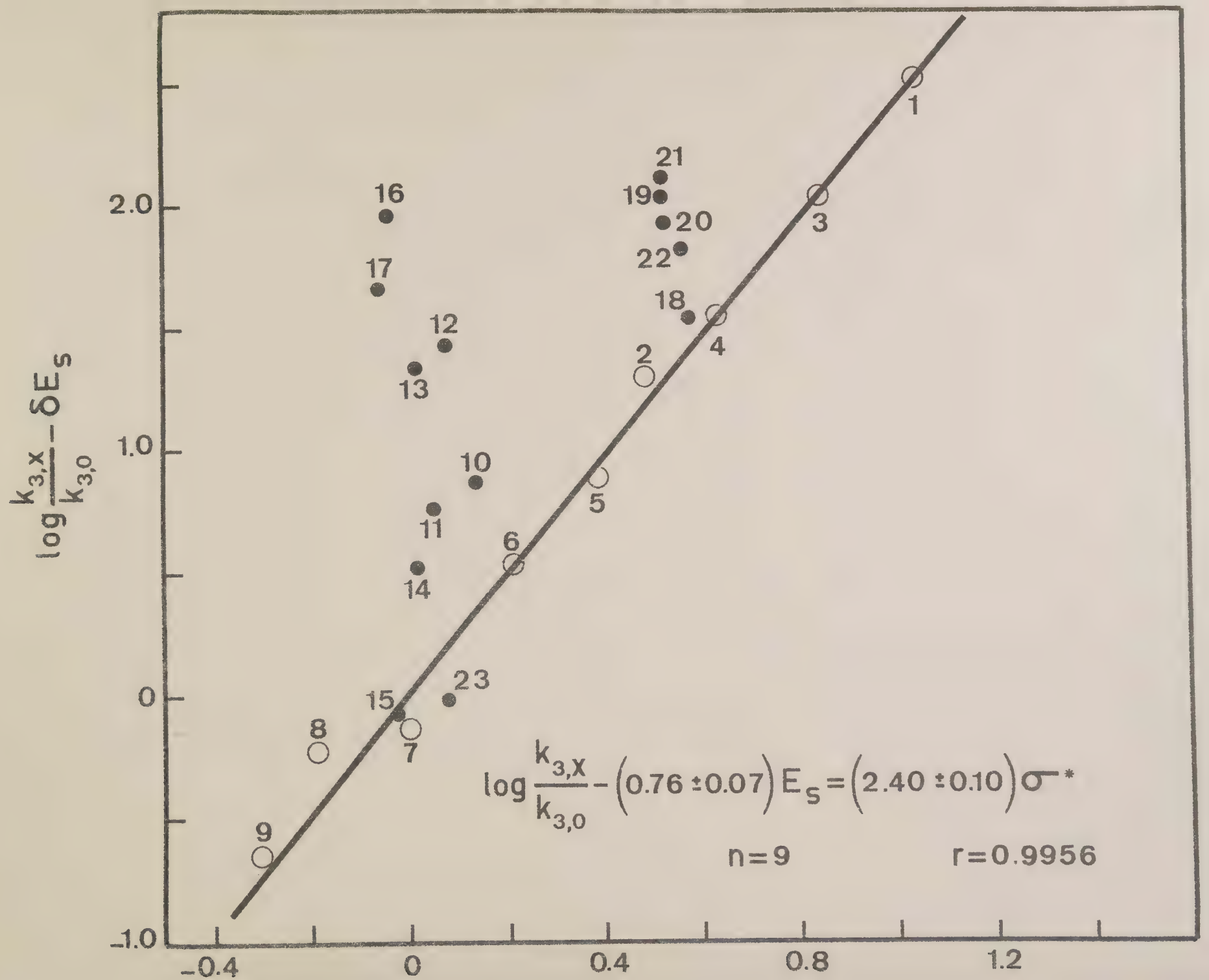
	R	σ^*	E_s	π	S_d	S_a
1	$ClCH_2$	1.05	-.24		0	0
2	H	.49	1.24		0	0
3	ICH_2	.85	-.37		0	0
4	CH_3OCH_2	.64[a]	-.19		0	0
5	$Cl(CH_2)_2$	.385	-.9	1.39	0	0
6	$C_6H_5CH_2$	.215	-.38	2.63	0	.93
7	CH_3	.0	.0		0	0
8	$(CH_3)_2CH$	-.19	-.47		0	0
9	$(CH_3)_3C$	-.3	-1.54		0	0
10	$Cl(CH_2)_3$	.14[b]	-.35[d]	1.89	.526	.50
11	$Cl(CH_2)_4$	.051[b]	-.35[d]	2.39	.64	.67
12	$C_6H_5(CH_2)_2$	.08	-.38	3.13	1.234	2.17
13	$C_6H_5(CH_2)_3$	.02	-.45	3.63	1.289	1.77
14	$C_6H_5(CH_2)_4$	.02[b]	-.45[d]	4.13	.477	.51
15	$\beta(C_8H_6N)CH_2$	-.022[b]	-.75±.1[d]	2.64	-.03 ±.08	>1.4
16	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_2$	-.037[b]	-.75±.1[d]	3.14[e]	2.05 ±.15	2.97 ± .1
17	$\beta(C_8H_6N)(CH_2)_3$	-.052[b]	-.82±.1[d]	3.64[e,f]	1.79 ±.15	2.26 ± .1
18	$HCONHCH_2$	.582[b]	-.36±.1[d]	-1.21[e,f]	.132±.077	-.45 ± .0
19	$CH_3CONHCH_2$	.56[b]	-.39±.1[d]	-.71[e,f]	.70 ±.08	-.84 ± .0
20	$CH_3CH_2CONHCH_2$	.55[b]	-.40±.1[d]	-.21[e,f]	.58 ±.08	-.87 ± .0
21	$CH_3(CH_2)_2CONHCH_2$	.56[b]	-.40±.1[d]	.29[e,f]	.77 ±.08	-.76 ± .0
22	$C_6H_5CH_2OCONHCH_2$	.57[b]	-.45±.1[d]	1.74[f,g]	.45 ±.08	.36 ± .0
23	$CH_3CONH(CH_2)_3$	.075[c]	-.40±.1[d]	.29[e]	-.22 ±.08	> .3

Légende du TABLEAU VIII.

[a] D'après Ballinger et Long (1960). [b] Ces valeurs de σ^* ont été calculées à partir des valeurs de σ_i obtenues par mesures des pK des acides correspondants (Charton, 1964). [c] Cette valeur a été calculée en utilisant un facteur de 2,73 pour l'atténuation de l'effet inductif d'un substituant lors de l'interposition d'un groupe méthylène (Wells, 1962). [d] Les valeurs de E_s ont été estimées après comparaison des substituants avec d'autres substituants de taille semblable et dont les E_s sont connus (Taft, 1956). [e] Valeurs calculées selon les règles établies par Hansch (Fujita et coll., 1964 ; Hansch et Anderson 1967).

[f] Pour ces composés, si nous considérons uniquement la partie aliphatique pour le calcul de π, nous n'avons pas observé d'amélioration dans la corrélation entre S_d, ou S_a, et π. [g] Valeur de π calculée à partir du log P pour le N-méthyl phényl carbamate (Hansch et Anderson, 1967).

Fig. 2 - Etape de désacylation. Représentation de la relation de TAFT-INGOLD pour l'hydrolyse chymotrypsique d'esters de paranitrophénol de différents acides carboxyliques. La droite de corrélation a été calculée à partir des points représentés par des cercles évidés au moyen d'un calcul itératif selon la relation de TAFT-INGOLD. Seuls ont été utilisés pour ce calcul les composés pour lesquels les valeurs de σ^* et de E_s étaient données par TAFT (1956). Les numéros se rapportent aux composés du Tableau VII.


$\log \frac{k_{3,x}}{k_{3,0}} - \delta E_s$
2.0
1.0
0
-1.0
-0.4
0
0.4
0.8
1.2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
$\log \frac{k_{3,x}}{k_{3,0}} - (0.76 \pm 0.07) E_s = (2.40 \pm 0.10) \sigma^*$
n=9
r=0.9956

$$\log k_{3,x}/k_{3,o} = (2,40 \pm 0,10)\ \sigma^* + (0,76 \pm 0,07)\ E_s \qquad (21)$$

$r = 0,9956$; $n = 9$ (composés numérotés de 1 à 9 dans le Tableau VII)

Dans l'équation 21, la constante $k_{3,x}$ représente la constante de désacylation pour un acyl-enzyme quelconque, $k_{3,o}$ la constante de désacylation de l'acyl-enzyme pris comme référence ($R=CH_3$). La réactivité des composés utilisés pour établir l'équation de corrélation 21 se situe dans une gamme importante : le rapport maximum des constantes de désacylation est voisin de $1,5\ 10^4$ (composés n° 1 à 9 dans le Tableau VII). De même, les constantes polaires et stériques E_s des substituants sont réparties sur une échelle de valeurs très large (cf Tableau VIII). Outre la valeur du coefficient de corrélation et le nombre de composés considérés, une gamme étendue des réactivités et des constantes caractéristiques des substituants sont des facteurs importants pour la recherche d'une équation de corrélation.

Un certain nombre de composés s'écartent de la droite de corrélation (Fig. 2) et nous avons été conduit à introduire un élément supplémentaire dans l'équation 21 pour rendre compte de ces déviations selon l'équation 22 :

$$\log k_{3,x}/k_{3,o} - \delta E_s - S_d = \rho^* \sigma^* \qquad (22)$$

S_d est définie comme la distance entre les points expérimentaux et la droite de corrélation et nous avons noté respectivement S_d pour désacylation et S_a pour acylation. Les valeurs

Fig. 3 - Constante de spécificité de désacylation S_d en fonction de la longueur du groupe acyle (l est exprimée en Å et a été mesurée, à partir du carbone du carbonyle, au moyen de modèles moléculaires en supposant une structure totalement allongée). Les numéros se rapportent aux composés du Tableau VIII. Δ , R = $Cl(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3,4 ; O, R = $C_6H_5(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3,4 ; ●, R = β $(C_8H_6N)(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3 ; ▲, dérivés de la glycine. Le fait que le composé n° 20 se situe plus bas que ses homologues inférieur (n° 19) et supérieur (n° 21) n'est pas considéré comme significatif, compte tenu de la relative instabilité de ces composés dans l'eau.

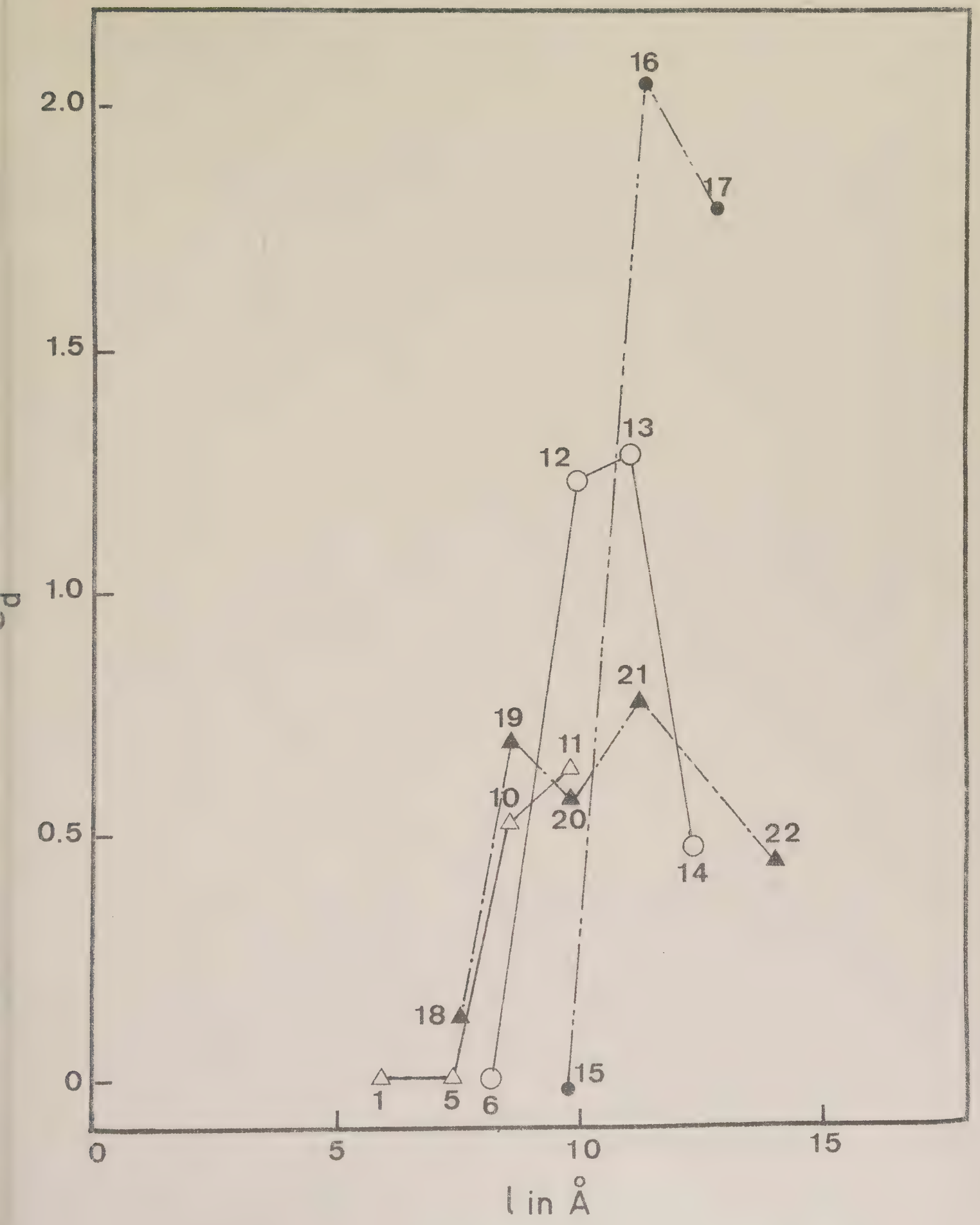
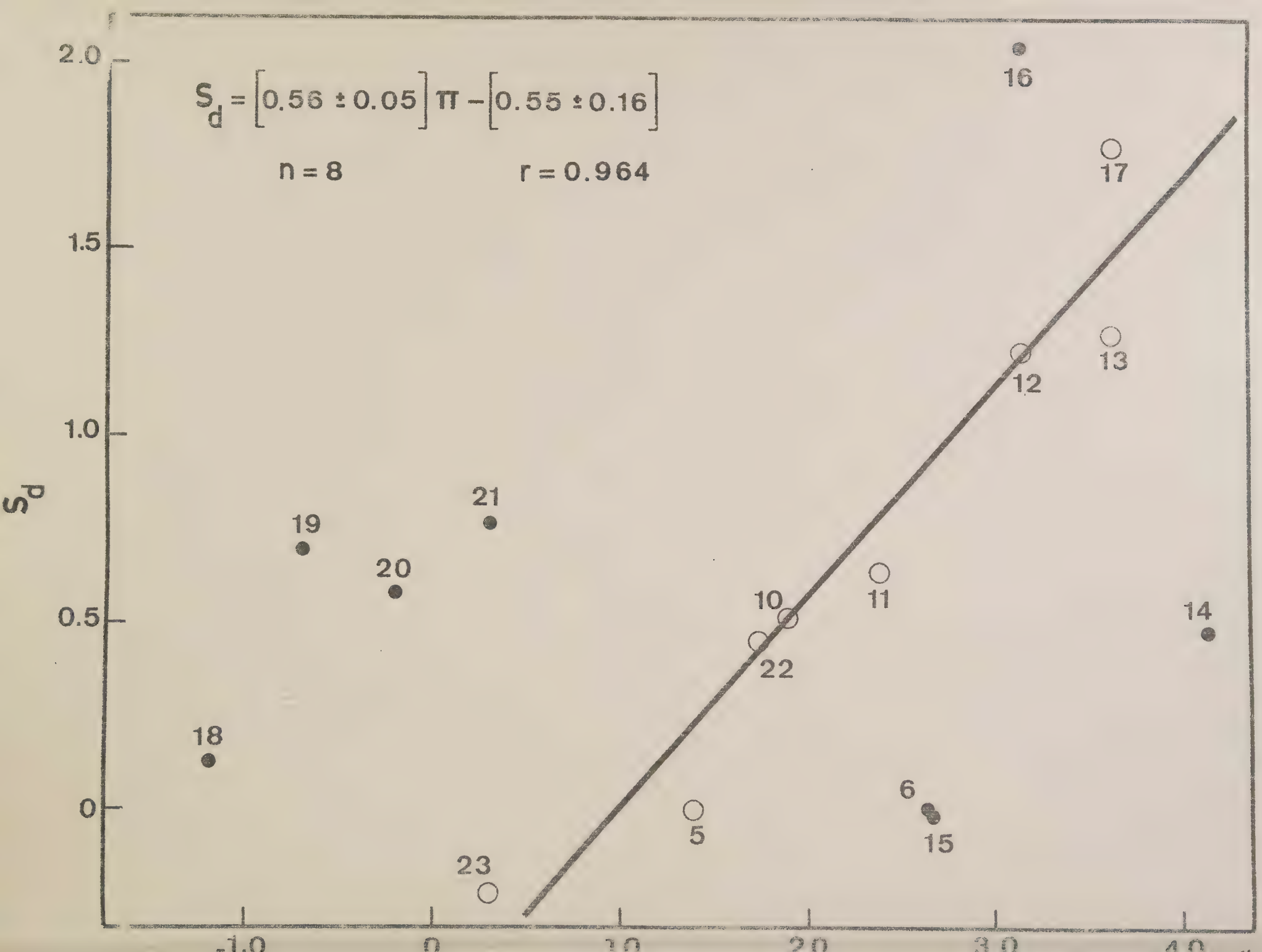

2.0
1.5
1.0
0.5
0
0
5
10
15
l in Å
16
17
13
12
21
19
11
10
20
22
14
18
15
1
5
6

Fig. 4 - Constante de spécificité de désacylation S_d en fonction de π , "constante hydrophobe" des substituants. La droite de corrélation a été calculée à partir des points représentés par des cercles évidés. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau VIII. Les valeurs de S_d et de π sont données dans le Tableau VIII.


$S_d = [0.56 \pm 0.05]\pi - [0.55 \pm 0.16]$
n = 8
r = 0.964
S_d
2.0
1.5
1.0
0.5
0
-1.0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
16
17
13
12
21
19
20
10
11
14
22
18
6
5
15
23

de cette constante pour la désacylation des divers acyl-enzymes sont reportées dans le Tableau VIII.

La spécificité de l'α-chymotrypsine se manifeste essentiellement comme une "spécificité de taille". En effet, dans la figure 3, la constante de spécificité S_d, pour différentes séries d'acyl-enzymes, devient positive à partir d'une longueur particulière de la fonction acyle (environ 7-8 Å) et passe par un maximum quand cette longueur augmente. Il faut noter que ce maximum est atteint pour une même longueur de chaîne dans chaque série, environ 10-12 Å.

Récemment, HANSCH (1972) a évalué les effets électroniques, stériques et hydrophobes des substituants sur l'étape de désacylation en utilisant une partie de nos résultats (DUPAIX et coll., 1970). Cet auteur trouve que les forces hydrophobes jouent un rôle positif dans l'étape de désacylation, ainsi que le montre le coefficient positif dans la corrélation établie entre log k_3 et la constante π . Appelée par HANSCH "hydrophobic constant", π est en fait le logarithme du coefficient de partage d'un substituant dans le système octanol-eau. Dans la figure 4, nous avons porté la constante de spécificité S_d pour certains acyl-enzymes à chaînes alkyles encombrées en fonction de la constante π des substituants. La corrélation trouvée est assez satisfaisante en ce qui concerne quelques substituants constitués de chaînes chloro-alkyles (n° 5, 10, 11), de chaînes phényl-alkyles (n° 12, 13) ainsi que pour certains substituants particuliers comme le 4- (3-indole) - butyryle (n° 17), la Z-glycyle (n° 22) et le 4-acétamido-butyryle (n° 23). Mais de nombreuses déviations

sont observées (n° 6, 14, 15, 16) ; la majorité des dérivés de la glycine (18-21) n'obéissent pas à la relation. La déviation positive observée pour le substituant n° 16, l'indole-propionyle, peut être due à un ajustement optimum du noyau indole sur la surface de l'enzyme. Cependant, l'amplitude de cette déviation peut être liée au choix de l'échelle d'hydrophobie. Ainsi, en mesurant le transfert d'amino acides possèdant les chaînes latérales 12 et 16, du dioxane (ou éthanol) à l'eau, NOZAKI et TANFORD (1971) ont trouvé que le substituant n° 16 était plus hydrophobe que le substituant n° 12, alors que les valeurs de π pour ces dérivés sont identiques dans le système octanol-eau.

Des substituants encombrés comme le phénylacétyle(n° 6) et le (3-indole)-acétyle (n° 15) ne sont pas reconnus par l'enzyme au contraire de substituants à chaînes plus longues comme le 3-phényl-propionyle (n° 12) et le 3-(3-indole)-propionyle (n° 16) : il est vraisemblable que, dans l'acyl-enzyme, la libre rotation de la molécule autour de la liaison $C^{\beta}—C^{\gamma}$ est nécessaire pour la fixation de la chaîne alkyle sur l'enzyme.

Mention particulière doit être faite pour les dérivés de la glycine. En dépit de la présence du groupe acétamido -CONH-, aucune reconnaissance spécifique de ces composés par l'enzyme n'apparaît, si ce n'est celle liée à leur longueur (cf Fig. 3). La constante de spécificité de désacylation du formylglycyl-enzyme est proche de zéro (S_d = 0,132), et la valeur de S_d la plus élevée dans cette série est celle du

butyryl-glycyl-enzyme ($S_d \simeq 0,8$) ; cette valeur n'est pas très différente de celle du 5-chlorovaléryl-enzyme (n° 11) pour lequel $S_d = 0,64$. Ainsi, dans le cas des dérivés de la glycine, il ne semble pas que le groupe acétamido -CONH- interagisse, dans l'acyl-enzyme, avec un site accepteur d'une liaison hydrogène dans la protéine, comme l'ont suggéré divers auteurs pour d'autres dérivés d'acides aminés (INGLES et KNOWLES, 1968); COHEN et coll., 1969).

Il est donc évident que les composants structuraux des meilleurs substrats doivent comporter une partie acyle de longueur optimale (10-12 Å) et dont l'extrémité de la chaîne soit hydrophobe plutôt que la chaîne toute entière. Ce dernier point est particulièrement démontré par la comparaison des constantes de spécificité de désacylation pour le butyrylglycyl-enzyme (n° 21, $S_d = 0,77$) et le 4-acétamidobutyryl-enzyme (n° 23, $S_d = - 0,22$) alors que la longueur de leur chaîne est identique.

- Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m

La recherche d'une relation linéaire d'énergie libre pour l'étape d'acylation, entre les constantes de vitesse du second ordre k_{cat}/K_m et les constantes polaires σ^* et stériques E_s nous a conduit à l'équation :

$$\log \frac{(k_{cat}/K_m)_x}{(k_{cat}/K_m)_o} = (2,18 \pm 0,17)\ \sigma^* + (0,53 \pm 0,10)\ E_s \qquad (23)$$

avec n = 9, r = 0,948.

Fig. 6 - Constante de spécificité d'acylation S_a en fonction de la longueur l du groupe acyle (l est exprimée en Å et a été mesurée, à partir du carbone du carbonyle au moyen de modèles moléculaires en supposant une structure totalement allongée). Les numéros se rapportent aux composés du Tableau VIII. △ , R = $Cl(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3,4 ; O, R = $C_6H_5(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3,4 ; ●, R = $\beta(C_8H_6N)(CH_2)_n$ avec n = 1,2,3 ; ▲ , dérivés de la glycine.

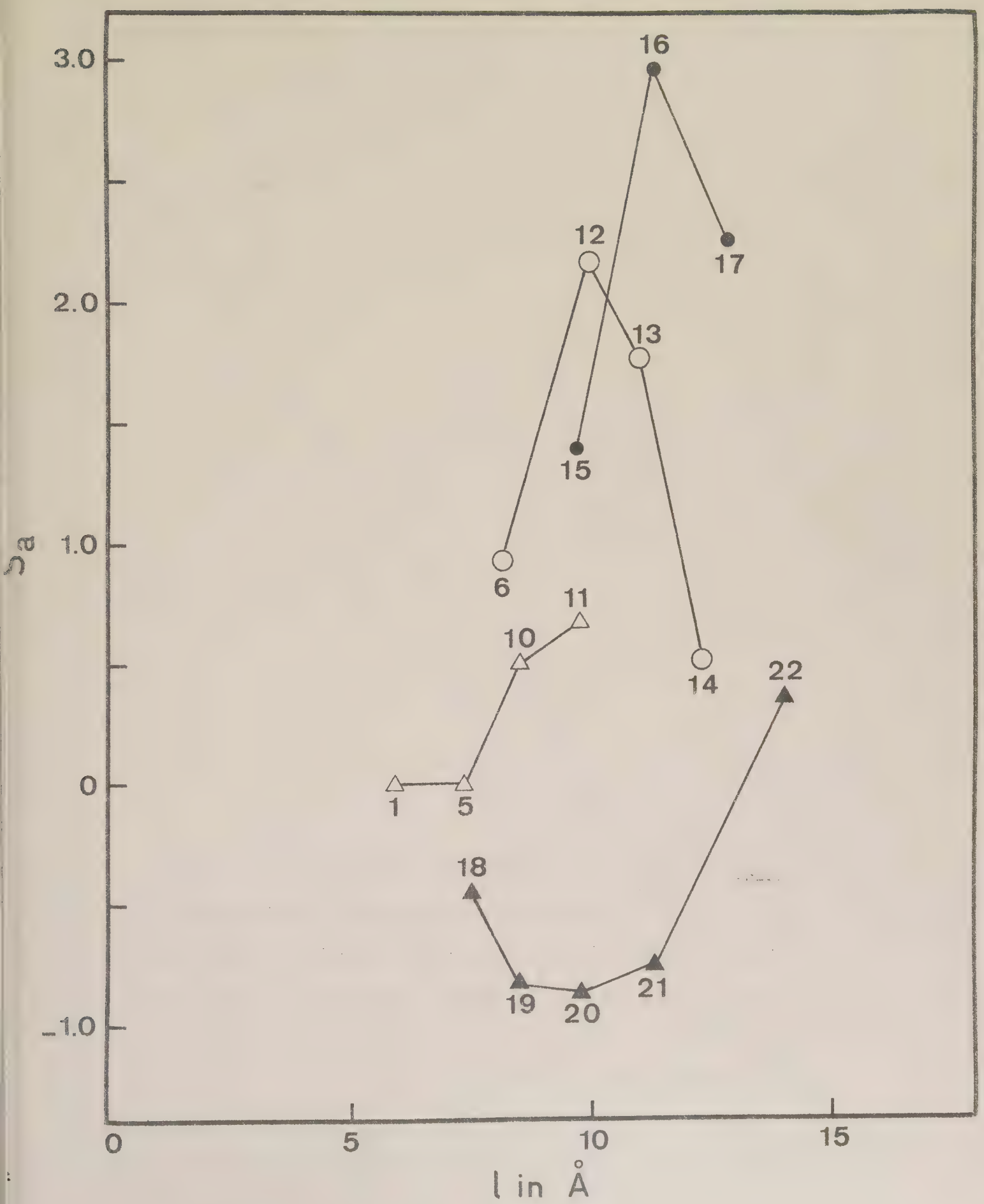
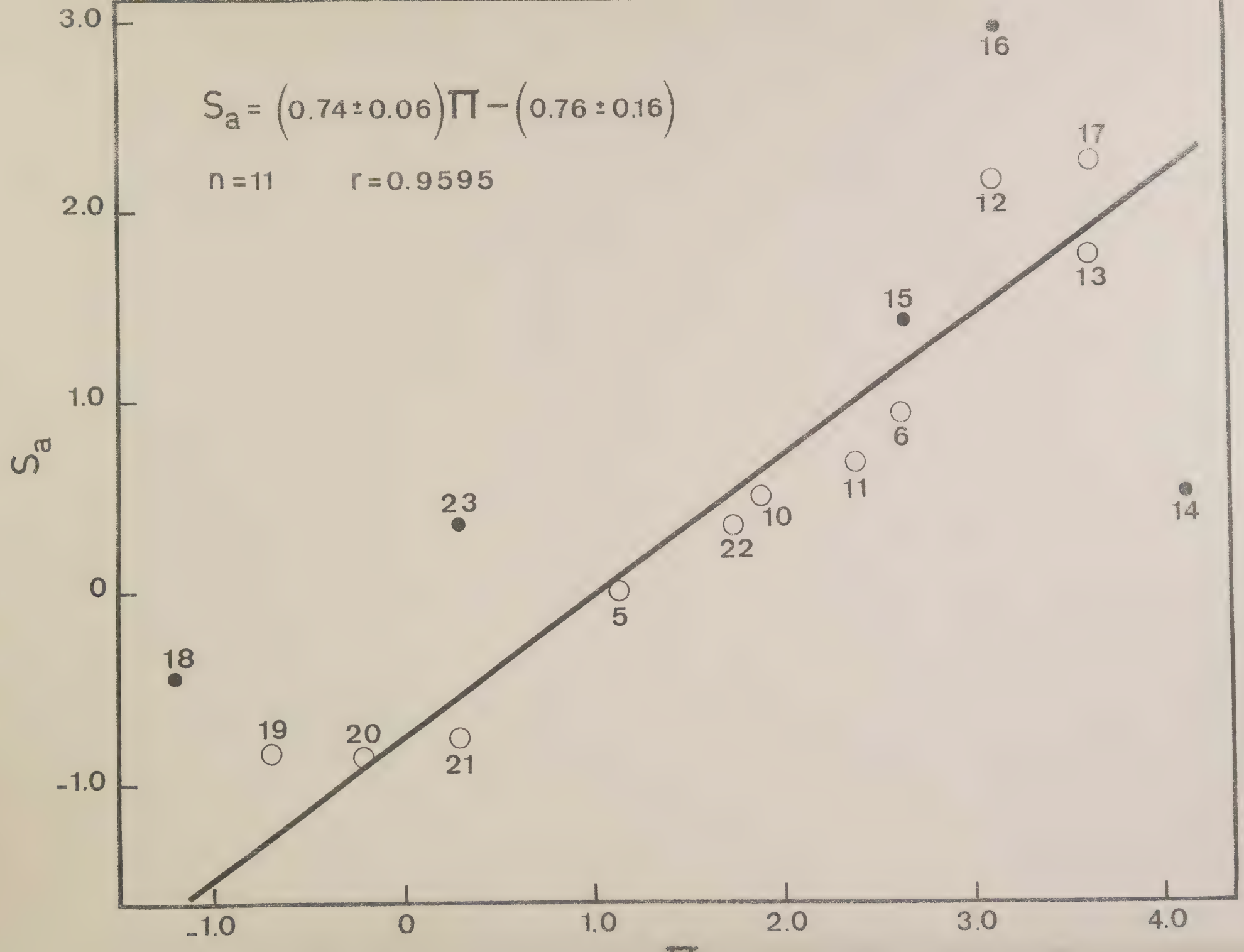

3.0
2.0
1.0
0
−1.0
$\Delta\alpha$
0
5
10
15
l in Å
16
12
17
13
15
6
11
10
14
22
1
5
18
19
20
21

Fig. 7 - Constante de spécificité d'acylation S_a en fonction de π , "constante hydrophobe" des substituants. La droite de corrélation a été calculée à partir des points représentés par des cercles évidés. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau VIII. Les valeurs de S_a et de π sont données dans le Tableau VIII.


$S_a = (0.74 \pm 0.06)\Pi - (0.76 \pm 0.16)$
n = 11
r = 0.9595
S_a
Π
3.0
2.0
1.0
0
-1.0
-1.0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
16
17
12
13
15
6
11
14
23
10
22
5
18
19
20
21

La valeur expérimentale de k_{cat}/K_m pour le composé n° 6 est près de 10 fois celle que nous pouvons calculer d'après l'équation 23. Si ce composé n'est pas pris en considération pour établir l'équation de corrélation, les valeurs de ρ^* et de δ ne changent pas beaucoup, mais leurs variances sont meilleures ainsi que le coefficient de corrélation. Soit :

$$\log \frac{(k_{cat}/K_m)_x}{(k_{cat}/K_m)_o} = (2,19 \pm 0,12)\ \sigma^* + (0,53 \pm 0,07)\ E_s \qquad (24)$$

avec n = 8 ; r = 0,990.

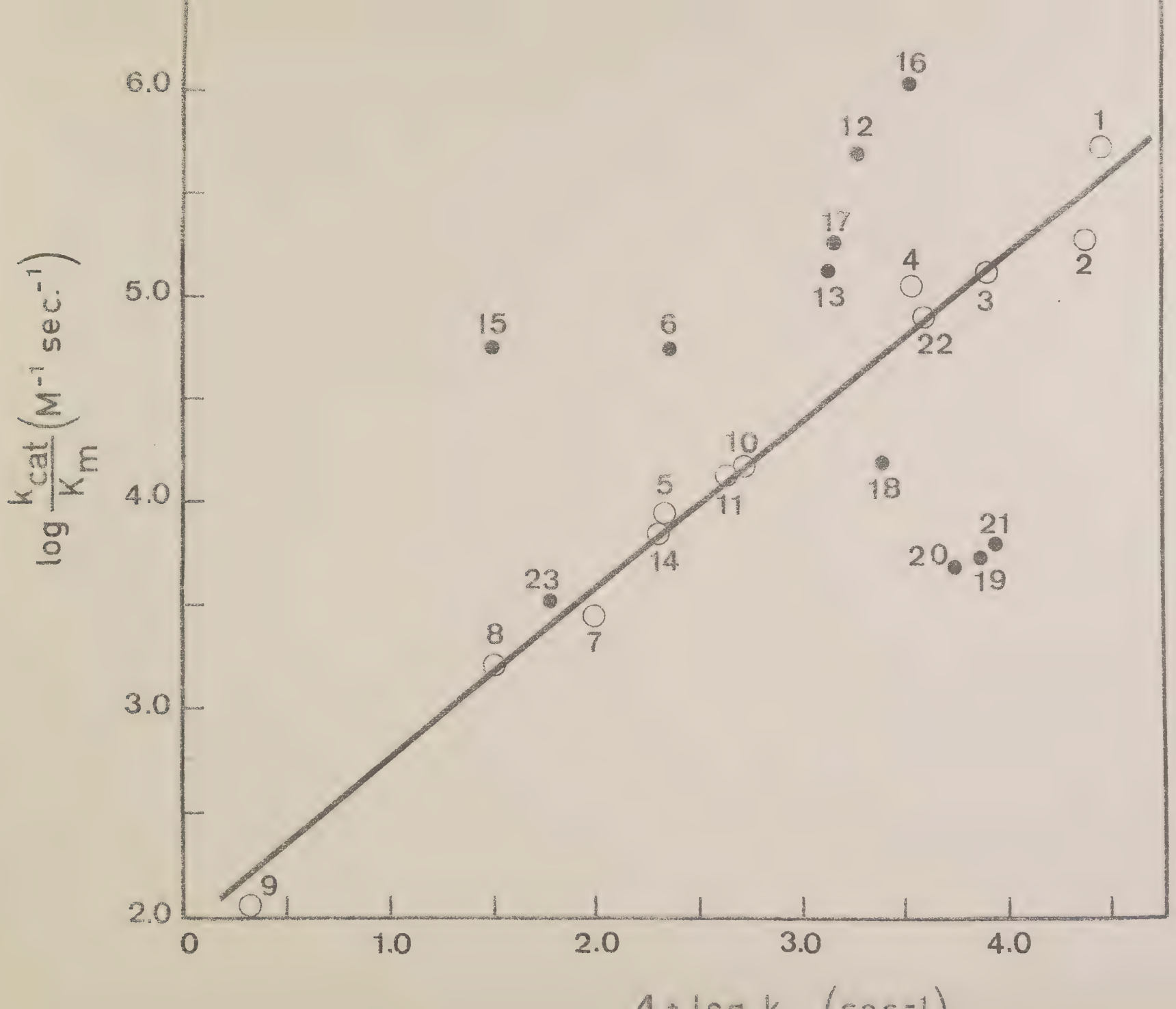
De nombreux composés tombent au-dessus ou en-dessous de la droite de corrélation (cf Fig. 5). Nous pouvons alors écrire une équation de forme générale semblable à celle établie pour l'étape de désacylation :

$$\log \frac{(k_{cat}/K_m)_x}{(k_{cat}/K_m)_o} - \delta E_s - S_a = \rho^* \sigma^* \qquad (25)$$

Les valeurs des constantes de spécificité S_a de l'étape d'acylation sont reportées dans le Tableau VIII.

La constante de spécificité d'acylation S_a peut être analysée en fonction de la longueur de la chaîne d'une part (Fig. 6). D'autre part, une corrélation entre le caractère hydrophobe des différents substituants et S_a peut être établie (Fig. 7). Comme le montre la figure 6, S_a est optimale pour les composés dont la longueur de chaîne est environ égale à 10 Å, mais dans le cas des dérivés de la glycine, nous

Fig. 8 - Logarithmes des constantes de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m en fonction des logarithmes des constantes de vitesse de désacylation k_3 obtenues lors de l'hydrolyse chymotrypsique des composés 1 à 23 (voir Tableau VII). L'équation de corrélation donnée dans le texte a été calculée à partir des points représentés par des cercles évidés.


$\log \frac{k_{cat}}{K_m} \left(M^{-1} \text{ sec.}^{-1}\right)$
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
$4 + \log k_{cat} \text{ (sec}^{-1})$
16
12
1
17
2
4
13
3
15
6
22
10
18
5
11
21
14
20
19
23
8
7
9

observons un profil inversé. Ce point sera discuté ultérieurement. La figure 7 montre la relation linéaire entre les valeurs de S_a et les valeurs de π pour des substituants encombrants. La corrélation obtenue est meilleure (n = 11, r = 0,960) que celle observée lors de l'étape de désacylation ; toutefois, les substituants n° 14, 16, 18 et 23 s'écartent de la droite de corrélation.

Dans la figure 8, nous avons porté le logarithme de k_{cat}/K_m en fonction du logarithme des constantes de vitesse de désacylation correspondantes k_3 pour l'hydrolyse chymotrypsique de tous les esters paranitrophényliques portés sur le Tableau VII. L'équation de corrélation est de la forme :

$$\log k_{cat}/K_m = (0,84 \pm 0,03) \log k_3 + (5,89 \pm 0,25) \qquad (26)$$

avec n = 12, r = 0,993.

La plupart des composés qui obéissent à l'équation de TAFT-INGOLD lors de l'étape de désacylation suivent le même ordre de réactivité lors de la formation de l'acyl-enzyme. Cependant, certains composés s'écartent positivement ou négativement. Ainsi les dérivés de la glycine, à l'exception du dérivé n° 22 s'écartent négativement, alors que les composés comportant des noyaux phényle ou indole se placent au-dessus de la droite de corrélation.

- Effets des substituants sur le pK_1'' mesuré lors de la désacylation des acyl-chymotrypsines substituées.

A partir de nos résultats (DUPAIX et coll., 1970), HANSCH (1972) a trouvé une relation entre les valeurs des pK_1'' mesurés lors de la désacylation des acyl-chymotrypsines et les paramètres de TAFT, σ^* et E_s. Le caractère apolaire des substituants, exprimé par π, n'a pas d'influence sur les valeurs des pK_1''. La valeur de $\rho^* = - 0,4 \pm 0,14$, calculée par HANSCH, indique que les substituants donneurs d'électrons augmentent la valeur du pK_1''. BERNHARD et coll. (1966) ont également trouvé une relation entre les pK_1'' mesurés lors de la désacylation de divers aroyl- et β-arylacryloyl-chymotrypsines et les valeurs des pK_a des acides carboxyliques correspondants. Ces auteurs ont suggéré que ce phénomène résultait d'une interaction chimique entre l'oxygène du carbonyle du substrat et un proton dissociable d'un résidu d'acide aminé de l'enzyme.

. Discussion

- Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation.

L'étape de désacylation est une réaction intramoléculaire ; au cours de telles réactions, les effets stériques peuvent être complexes et induire d'importantes augmentations dans la vitesse des réactions (KIRBY et LANCASTER, 1970). Cependant, malgré un certain nombre de limitations (changement d'étape limitante, mécanismes réactionnels compétitifs), il est possible d'utiliser l'analyse de TAFT pour normaliser les données cinétiques et permettre une séparation entre les effets non spécifiques et les effets spécifiques des substituants par comparaison avec une réaction non enzymatique.

Les valeurs des constantes polaire et stérique de la réaction, respectivement égales à $\rho^* = 2,40 \pm 0,10$ et $\delta = 0,76 \pm 0,07$, sont comparables aux valeurs obtenues lors de l'hydrolyse catalysée par la soude d'esters éthyliques (TAFT, 1956) ou phényliques (HOLMQUIST et BRUICE, 1969a et b ; BRUICE et coll., 1970) d'acides carboxyliques. La valeur positive de ρ^* indique l'existence d'un mécanisme de catalyse basique lors de l'étape de désacylation (CAPLOW et JENCKS, 1962). La similitude des valeurs de δ pour l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse alcaline signifie que la différence d'encombrement stérique exercé par les substituants R entre l'état fondamental et l'état de transition de la réaction est comparable pour les deux types de réaction.

Récemment, BLACKBURN et DODDS (1971) ont montré que l'hydrolyse de la N-acétyl-O-formylserineamide, un modèle de la formyl-α-chymotrypsine, était catalysée par l'imidazole fonctionnant en tant que base générale, la constante de vitesse du second ordre étant égale à $1,77\ 10^{-4}\ M^{-1}sec^{-1}$ à 25°. Si nous supposons que la catalyse intramoléculaire par l'imidazole est équivalente à une catalyse intermoléculaire par l'imidazole 10 M (BENDER et coll., 1964b), la formyl-α-chymotrypsine est hydrolysée au moins 10^3 fois mieux que la N-acétyl-O-formylserineamide ($2,43/1,77\ 10^{-4}.\ 10$). La grande réactivité de cet acyl-enzyme non spécifique doit être due plutôt au grand pouvoir nucléophile de la molécule d'eau responsable de l'attaque de la liaison sensible et activée par le système de relai de charges (BLOW et coll., 1969) qu'à une configuration ou à des propriétés électroniques particulières de la

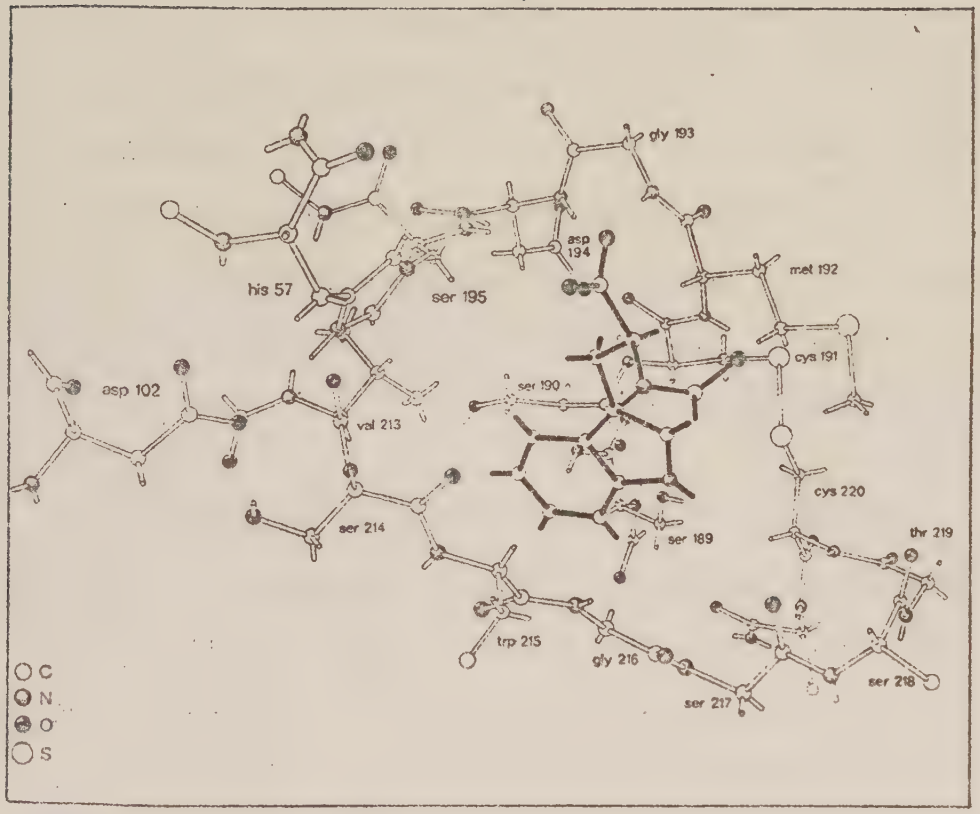


Figure 9. Site actif de l'α-chymotrypsine; interaction du formyl-L-tryptophane avec l'enzyme, d'après Steitz et coll., 1969.

liaison ester de l'acyl-enzyme. Ceci est suggéré par le fait que les effets polaires et stériques des substituants R de petites tailles sur l'étape de désacylation sont semblables aux effets observés lors de l'hydrolyse catalysée par l'ion hydroxyle (valeurs de ρ^* et δ semblables pour les deux types de réaction).

La désacylation est favorisée quand la fonction acyle de l'acyl-enzyme possède une longueur optimale de la chaîne égale à environ 10-12 Å, un caractère hydrophobe de la terminaison de cette chaîne et enfin la possibilité d'une libre rotation de la molécule autour de la liaison $C^{\beta} - C^{\gamma}$.

HENDERSON (1970) a publié récemment la structure de l'indoleacryloyl-α-chymotrypsine, établie à partir de données cristallographiques à pH 4 et à 2,5 Å de résolution. L'auteur montre que la fonction acyle, formant une liaison ester avec l'oxygène de la chaîne latérale de la sérine 195, entre en interaction avec l'enzyme au moyen du noyau indole fixé dans une poche située sur la surface de la protéine. Précédemment, STEITZ et coll. (1969) avaient montré que cette poche, de dimensions 10-12 Å par 5,5-6,5 Å par 3,5-4 Å, pouvait recevoir la chaîne latérale aromatique des N-For-L-tryptophane et N-For-D-phénylalanine (cf Fig. 9).

En ce qui concerne les composés étudiés au laboratoire, il est vraisemblable que le meilleur acyl-enzyme, l'indolepropionyl-α-chymotrypsine, dont la désacylation est relativement spécifique ($S_d = 2,05 \pm 0,15$) possède la même configuration

que l'indoleacryloyl-α-chymotrypsine à pH 4 ainsi qu'à pH neutre.

Dans des conditions expérimentales voisines, l'indoleacryloyl-α-chymotrypsine et l'indolepropionyl-α-chymotrypsine se désacylent avec des constantes de vitesse du premier ordre égales à 4, 10^{-3} sec^{-1} (BERNHARD et TASHJIAN, 1965) et 0,34 sec^{-1}. Nous trouvons une différence semblable dans les valeurs des constantes de vitesse de désacylation de la benzoyl-α-chymotrypsine (k_3 = 4,2 10^{-4} sec^{-1}) et de la phénylacétyl-α-chymotrypsine (k_3 = 2,2 10^{-2} sec^{-1}), ainsi que pour la désacylation de la cinnamoyl-α-chymotrypsine (k_3 = 1,25 10^{-2} sec^{-1} ; BENDER et coll., 1962) comparée à la désacylation de la phénylpropionyl-α-chymotrypsine (k_3 = 0,186 sec^{-1}). De telles différences sont couramment observées lors de l'hydrolyse alcaline de dérivés saturés ou insaturés (TAFT, 1956). Ces différences sont attribuées à une stabilisation de l'état fondamental due aux effets de résonance entre la double liaison des composés insaturés et le groupe carbonyle de l'ester. Ce résultat implique que, dans l'étape de désacylation, les états de transition sont saturés quelle que puisse être la structure des états fondamentaux.

Dans l'acyl-enzyme, il existe une liaison covalente entre la sérine 195 et le carbonyle du substrat ; si la chaîne de la fonction acyle est trop courte (inférieure à 8 Å) ou trop longue (supérieure à 13 Å) ou si cette chaîne ne peut pas tourner autour de la liaison $C^{\beta}-C^{\gamma}$, le groupe acylant

la sérine ne pourra pas se fixer correctement dans la poche hydrophobe de l'enzyme et ne sera pas, ou sera mal, reconnu.

—Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation.

Les effets des substituants R sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre $k_{cat}/K_m = k_2/K_s$ peuvent être complexes car les constantes k_2 et K_s peuvent être différemment affectées par la nature de R. Il n'est donc pas facile de séparer sans ambiguïté les effets portant sur k_2 et sur K_s.

Toutefois, les valeurs des constantes polaires ρ^* et stériques δ obtenues au cours de l'acylation de l'α-chymotrypsine par les différents esters paranitrophényliques d'acides carboxyliques sont semblables aux constantes calculées lors de l'étude de l'étape de désacylation et, par conséquent, caractérisent plutôt le processus d'acylation lui-même (k_2) que le processus d'adsorption du substrat (K_s). De plus, il est connu que les étapes d'acylation (k_2) et de désacylation (k_3) font appel à des mécanismes identiques (BENDER et KEZDY, 1964).

La valeur de la constante polaire de la réaction $\rho^* = 2,19$ rappelle plutôt la réaction d'esters d'orthonitrophénol d'acides carboxyliques avec des bases oxygénées pour lesquelles $\rho^* = 2,35$ que la réaction de ces mêmes esters avec des bases azotées pour lesquelles $\rho^* = 1,44$ (HOLMQUIST et BRUICE, 1969b). De plus, la valeur de la constante stérique de la réaction $\delta = 0,53$ est très différente de la valeur de

δ trouvée pour l'hydrolyse d'esters de paranitrophénol catalysée par l'imidazole pour laquelle $\delta = 1,4$ (MILSTIEN et FIFE, 1968). Donc, les effets polaires et stériques exercés par les substituants R lors de l'étape d'acylation indiquent qu'une attaque nucléophile de l'oxygène de la sérine 195 est plus probable qu'une attaque nucléophile par l'imidazole de l'histidine 57. Ce résultat diffère de celui obtenu par HUBBARD et KIRSCH (1970 et 1972) pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par des esters paranitrophényliques de l'acide benzoïque diversement substitué sur le noyau benzène. Pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par ces dérivés conjugués, la valeur du coefficient ρ de HAMMETT est égale à 1,0 alors qu'elle est égale à 2,1 pour l'étape de désacylation (CAPLOW et JENCKS, 1962). HUBBARD et KIRSCH ont alors suggéré que l'imidazole de la chaîne latérale de l'histidine 57 de l'enzyme était l'accepteur primaire de la fonction acyle lors de la réaction de l'α-chymotrypsine avec les esters paranitrophényliques des acides benzoïques substitués.

D'une façon générale, les mêmes propriétés structurales de la partie acyle des substrats favorisent les étapes d'acylation et de désacylation, comme le montre la figure 8. En effet, pour de nombreux composés, log k_{cat}/K_m et log k_3 sont reliés linéairement ; néanmoins, deux sortes de composés n'obéissent pas à la corrélation. Les composés qui s'écartent positivement de la droite de corrélation possèdent un groupe aromatique dans leur structure et il est bien connu que les meilleurs substrats ou inhibiteurs de l'α-chymotrypsine demandent un tel type de

TABLEAU IX

Comparaison des valeurs de k_{cat}/K_m pour l'hydrolyse chymotrypsique de différents esters d'acides arylalcanoïques R-COOR' .

R	k_{cat} / K_m ($M^{-1}sec^{-1}$)		Rapports
	OMe [a]	ONp [b]	$\frac{(k_{cat}/K_m)_{ONp}}{(k_{cat}/K_m)_{OMe}}$
$C_6H_5CH_2$	1,37-1,76	$5,6\ 10^4$	$3,2\text{-}4,1\ 10^4$
$C_6H_5(CH_2)_2$	73,4-97,7	$5,0\ 10^5$	$5,1\text{-}6,8\ 10^3$
$C_6H_5(CH_2)_3$	144-192	$1,35\ 10^5$	$7,0\text{-}9,4\ 10^2$
$C_6H_5(CH_2)_4$	5,8-7,7	$0,74\ 10^4$	$9,6\text{-}12,8\ 10^2$
$(C_8H_6N)(CH_2)_2$	181-242	$1,12\ 10^6$	$4,65\text{-}6,2\ 10^3$

[a] Pattabiraman et Lawson (1972) ; pH 8 ; 25° ; 41,7% diméthylsulfoxyde-eau. Les valeurs reportées dans cette colonne du Tableau IX sont différentes de celles données par les auteurs d'un facteur 15-20, afin de les corriger de l'effet de solvant.

[b] Valeurs déterminées au laboratoire (cf. Tableau VII).

structure. D'autre part, les dérivés de la glycine, qui comportent une partie polaire (-CONH-), s'écartent négativement. BEREZIN et coll. (1970) ont trouvé une relation linéaire entre les constantes de fixation d'alcools aliphatiques et de composés aromatiques avec le centre actif de l'α-chymotrypsine et leur coefficient de partage respectif dans le système octanol-eau. Nous avons vu également que la représentation des constantes spécifiques d'acylation S_a en fonction de π était une droite (cf Fig. 7). Il est donc vraisemblable que nous pouvons analyser les déviation observées dans la figure 8 en termes de modifications de la constante de Michaëlis K_s. Les valeurs élevées des constantes de vitesse d'acylation k_2/K_s pour les dérivés aromatiques seraient dues à de faibles valeurs de K_s, alors que les déviations négatives des dérivés de la glycine peuvent être attribuées à des valeurs de K_s défavorables. INGLES et KNOWLES (1968) ont souligné que la présence d'un groupe acylaminé défavorisait la fixation des substrats ; ceci résulte de la difficulté de transférer un groupe acylaminé d'un milieu polaire à un milieu non polaire.

- Comparaison de l'hydrolyse enzymatique d'esters méthyliques et paranitrophényliques.

Un autre effet, en relation certainement avec celui discuté précédemment, est la réactivité anormale des esters paranitrophényliques pendant la formation de l'acyl-enzyme par rapport à celle des esters méthyliques correspondants. Dans le Tableau IX, sont données les valeurs de k_{cat}/K_m pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par une série d'esters

méthyliques d'acides arylalcanoïques (PATTABIRAMAN et LAWSON, 1972) et par les esters de paranitrophénol correspondants étudiés au laboratoire. Les rapports des constantes de vitesse d'acylation du second ordre $\frac{(k_{cat}/K_m)_{ONp}}{(k_{cat}/K_m)_{OMe}}$ sont élevés et varient dans la gamme $7\ 10^2$ - $4{,}1\ 10^4$ selon la nature du groupe acyle R. Des valeurs similaires ont également été rapportées par WILLIAMS (1970) pour les esters méthyliques et paranitrophényliques de l'acide cinnamique et de l'acétylglycine. Ces rapports sont plus élevés pour l'hydrolyse enzymatique que pour l'hydrolyse alcaline de ces mêmes esters (rapports $\simeq$ 50-100). Il en est de même pour l'hydrolyse chymotrypsique et l'hydrolyse alcaline d'esters plus spécifiques comme ceux de l'acétyl-L-phénylalanine ou acétyl-L-tryptophane (rapports $\simeq$ 50).

La différence de réactivité des esters de paranitrophénol comparée à celle des esters méthyliques peut être en partie due à une valeur plus favorable de la constante de Michaëlis K_s dans le rapport $k_{cat}/K_m = k_2/K_s$ pour les esters paranitrophényliques. Ainsi, l'interaction du groupe aryloxy avec la surface de l'enzyme pourrait abaisser les valeurs de K_s. PURDIE et BENOITON (1970) ont comparé l'activité de l'α-chymotrypsine vis-à-vis des esters paranitrobenzyliques et méthyliques de la L-phénylalanine (rapport $\simeq$ 100) et ont suggéré que la fonction aryle du groupe partant pouvait contribuer d'une façon substantielle à la fixation du substrat sur l'enzyme. HARDMAN et coll. (1971) ont également montré

la formation d'un complexe de Michaëlis lors de la réaction de l'α-chymotrypsine avec l'ester paranitrophénylique de l'acide acétique. A pH 7,1 la constante de dissociation enzyme-substrat a été trouvée égale à 1,85 mM.

Néanmoins, les raisons pour lesquelles un ester de paranitrophénol non spécifique possède une réactivité accrue par rapport à son homologue dont le groupe partant est mauvais ne sont pas claires. En effet, d'après les données de BENDER et NAKAMURA (1962), nous pouvons calculer un rapport des constantes de vitesse d'acylation du second ordre pour les esters paranitrophénylique et méthylique de l'acide acétique égal à 10^7-10^8. Nous avons estimé que les rapports pour les esters paranitrophényliques et éthyliques des acides formique et méthoxyacétique sont supérieurs à 10^5. Les constantes de vitesse du second ordre pour l'hydrolyse chymotrypsique des esters éthyliques de l'acide formique et de l'acide acétique ont été mesurées par potentiométrie et trouvées égales respectivement à 0,023 ± 0,006 M^{-1} sec^{-1} et 0,11 ± 0,02 M^{-1} sec^{-1}, à pH 7 ; 25° ; 0,5 M NaCl. Nous n'avons pu faire varier, dans une gamme étendue, les concentrations d'enzyme ($6,9\ 10^{-5}$M - $2,2\ 10^{-4}$M) et de substrats ($4,8\ 10^{-2}$M - $2,4\ 10^{-2}$M). Les rapports de k_{cat}/K_m pour les esters paranitrophényliques et éthyliques des acides formique et acétique ont été estimés respectivement à $6,8\ 10^5$ et $3,65\ 10^5$ à pH 7. Ni la différence dans la réactivité chimique du groupe partant, ni son éventuelle fixation sur l'enzyme ne peuvent rendre compte à elles seules do l'importance des rapports $(k_{cat}/K_m)_{ONp}/(k_{cat}/K_m)_{OEt}$. Récemment,

certains auteurs ont fourni des preuves pour l'existence d'un complexe tétraédrique dans l'hydrolyse d'esters phényliques (FRANKFATER et KEZDY, 1971), d'amides (FERSHT et REQUENA, 1971) et d'anilides (CAPLOW, 1969). La formation de cet intermédiaire est vraisemblablement l'étape limitante pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par la majorité des esters étudiés, mais pour les esters ayant un mauvais groupe partant et une fonction acyle non spécifique, la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique devient l'étape limitante et, par conséquent, la vitesse de l'hydrolyse enzymatique se trouve fortement diminuée. Pour l'hydrolyse d'esters de groupes partants différents, catalysée par l'imidazole, KIRSH et JENCKS (1964) ont observé une corrélation structure-réactivité non linéaire. Ils ont expliqué ce phénomène en termes d'une réaction à deux étapes ; selon la nature du substrat, la barrière d'énergie de la seconde étape augmenterait plus fortement que celle de la première étape. Un phénomène analogue pourrait, en partie, expliquer les différences de réactivité des esters éthyliques et paranitrophényliques de l'acide formique et de l'acide méthoxyacétique en présence d'α-chymotrypsine.

Légende du TABLEAU X.

[a] Conditions expérimentales : température, 25° ; 0,5 M NaCl ; 4,5 % (v/v) acétonitrile-eau. Les valeurs de K_m ont été obtenues à partir des mesures des vitesses d'hydrolyse à un pH constant de 7,56. pK_1'' et k_3 ont été obtenues par mesures des vitesses d'hydrolyse à différents pH et pour une concentration donnée de substrat ($S > K_m$). En supposant que la valeur de K_m était indépendante d pH ; la constante de vitesse de désacylation k_3 a été corrigée du K_m. Les données expérimentales ont été traitées par une calculatrice Wang 373. [b] Température, 25° ; 0,5 M NaCl; 4,5 % (v/v) acétonitrile-eau ; pH = 7.0. [c] Ces valeurs de K_m ont été estimées par hydrolyse enzymatique totale.

TABLEAU X

Constantes cinétiques obtenues lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-acylés.[a]

N-acylamino acides	pK''_1	Km X 10^6 M.	k_3 X $10^2 sec^{-1}$	k_{cat}/K_m X 10^{-4} M^{-1} sec^{-1}
1. For-Gly	6.95 ± 0.03	15.7 ± 0.8	24.5 ± 2.9	1.56 ± 0.18
2. Ac-Gly	6.87 ± 0.01	138. ± 11.	75.2 ± 2.3	0.54 ± 0.02
3. Pro-Gly	7.00 ± 0.015	113. ± 9.	55.95± 3.3	0.495± 0.03
4.But-Gly	6.936± 0.014	136. ± 22.	87.1 ± 6.2	0.64 ± 0.045
5. Z-Gly	7.01 ± 0.035	4.9 ± 0.5	41.1 ± 2.0	8.38 ± 0.40
6. For-L-Ala	6.93 ± 0.02	13.3 ± 0.9	24.6 ± 0.5	1.85 ± 0.04
7. For-D-Ala	7.08 ± 0.01	6.1 ± 0.5	7.2 ± 0.1	1.18 ± 0.02
8. Z-L-Ala	7.21 ± 0.02	20. ± 1.	304. ± 25.	15.2 ± 1.25
9. Z-D-Ala	7.43 ± 0.04	8.3 ± 0.9	8.99 ± 0.25	1.08 ± 0.03
10. Z-L-Abu	7.48 ± 0.02	1.8 ± 0.1	271. ± 15.	150. ± 8.
11. Z-D-Abu	7.26 ± 0.01	1.97 ± 0.02	3.53 ± 0.07	1.79 ± 0.03
12. Z-L-Val	7.27 ± 0.02	17.8 ± 1.4	11.85± 0.4	0.66 ± 0.02
13. Z-D-Val	7.16 ± 0.01	7.36 ± 0.84	0.79 ± 0.03	0.108± 0.004
14. Z-L-Nva	7.57 ± 0.02	2.67 ± 0.21	818. ± 57.	306. ± 21.
15. Z-D-Nva	7.45 ± 0.03	3.15 ± 0.20	14.94± 0.50	4.74 ± 0.16
16. Z-L-Leu	7.59 ± 0.04	4.8 ± 0.4	834. ± 45.	174. ± 9.
17. Z-D-Leu	7.22 ± 0.015	2.42 ± 0.29	11.05± 0.30	4.57 ± 0.12
18. Z-L-Nle	7.45 ± 0.06	5.8 ± 2.5	1230.± 200.	212. ± 34.
19. Z-L-Asn	7.25 ± 0.04	13.6 ± 1.3 [b]	3370.± 530.	248. ± 39.
20. Z-D-Asn	6.76 ± 0.03	1.46 ± 0.14 [b]	2.25 ± 0.05	1.54 ± 0.04
21. Z-L-Phe	7.53 ± 0.06	0.48 [c]	3915.± 100.	8156.± 210.
22. Z-D-Phe	7.65 ± 0.04	0.38 [c]	18.1 ± 1.	47.76± 2.6
23. Z-L-Trp	7.51 ± 0.07	< 0.5	1782.± 110.	> 3500.
24. Z-L-Lys	6.91 ± 0.04	43.± 3. [b]	294.± 12.	6.79 ± 0.28

Légende du TABLEAU XI.

[a] Les constantes polaires σ^* des substituants ont été calculées en utilisant l'équation 19 : $\sigma^* = 2{,}22\ \sigma_i$; les valeurs de σ_i sont elles-mêmes calculées à partir des valeurs des pK_a des acides correspondants (Charton, 1964).

[b] Les constantes stériques E_s des substituants ont été calculées à partir de l'équation 20 :

$$E_{s,\ R_1 \diagdown \atop R_2 \diagup CH} = 2.54\ (E_{s,R_1CH_2} + E_{s,\ R_2CH_2})$$

[c] Ces valeurs de σ^* ont été obtenues à partir des valeurs de σ_i données par Charton (1964), en utilisant l'équation 19. [d] Valeur de σ^* supposée égale à celle de la Z-L-Nva. [e] Valeur de σ^* supposée égale à celle de la Z-L-Phe.

TABLEAU XI

Valeurs des constantes polaires σ^* et stériques E_s pour les substituants $R_1NHCOCH(R_2)$- des esters paranitrophényliques d'acides aminés N-α-protégés : $R_1NHCOCH(R_2)COOC_6H_4p\text{-}NO_2$.

N-acylamino acides	σ^* [a]	E_s [b]
1. For-Gly	0.582[c]	- 0.36 ± 0.1
2. Ac-Gly	0.56 [c]	- 0.39 ± 0.1
3. Pro-Gly	0.56 [c]	- 0.40 ± 0.1
4. But-Gly	0.56 [c]	- 0.40 ± 0.1
5. Z-Gly	0.57	- 0.45 ± 0.1
6. For-L-Ala	0.68	- 1.1 ± 0.2
7. For-D-Ala	0.68	- 1.1 ± 0.2
8. Z-L-Ala	0.586	- 1.3 ± 0.2
9. Z-D-Ala	0.586	- 1.3 ± 0.2
10. Z-L-Abu	0.497	- 2.06 ± 0.3
11. Z-D-Abu	0.497	- 2.06 ± 0.3
12. Z-L-Val	0.45	- 3.5 ± 0.5
13. Z-D-Val	0.45	- 3.5 ± 0.5
14. Z-L-Nva	0.503	- 2.13 ± 0.3
15. Z-D-Nva	0.503	- 2.13 ± 0.3
16. Z-L-Leu	0.48	- 2.03 ± 0.3
17. Z-D-Leu	0.48	- 2.03 ± 0.3
18. Z-L-Nle	0.503 [d]	- 2.16 ± 0.3
19. Z-L-Asn	0.647	- 2.20 ± 0.3
20. Z-D-Asn	0.647	- 2.20 ± 0.3
21. Z-L-Phe	0.575	- 2.11 ± 0.3
22. Z-L-Phe	0.575	- 2.11 ± 0.3
23. Z-L-Trp	0.575 [e]	- 2.79 ± 0.3
24. Z-L-Lys	0.503 [d]	- 2.03 ± 0.3

TABLEAU XII

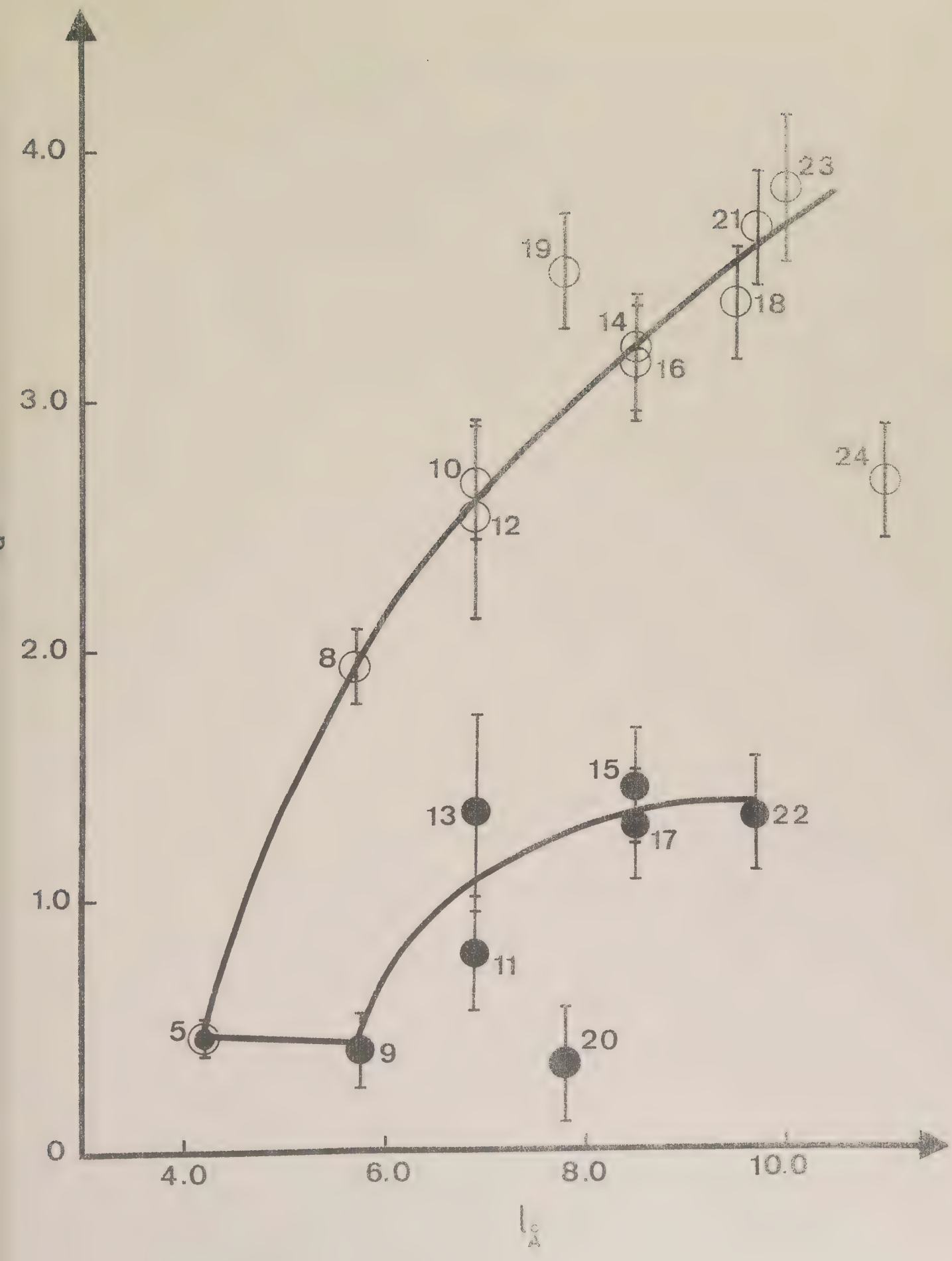
Hydrolyse par l'α-chymotrypsine d'esters paranitrophényliques d'acides aminés N-α-acylés : $R_1NHCOCH(R_2)COOC_6H_4p\text{-}NO_2$. Constantes de spécificité de désacylation (S_d) et d'acylation (S_a). Valeurs de la constante hydrophobe π pour les différents substituants de la chaîne latérale R_2H.

N-acylamino acides	S_d	S_a	π^a
1. For-Gly	0.14 ± 0.06	-0.44 ± 0.05	0
2. Ac-Gly	0.70 ± 0.08	-0.84 ± 0.05	0
3. Pro-Gly	0.575± 0.08	-0.87 ± 0.05	0
4. But-Gly	0.77 ± 0.08	-0.76 ± 0.05	0
5. Z-Gly	0.455± 0.08	0.36 ± 0.06	0
6. For-L-Ala	0.464± 0.15	-0.196± 0.010	0.5
7. For-D-Ala	-0.07 ± 0.15	-0.39 ± 0.10	0.5
8. Z-L-Ala	1.94 ± 0.15	1.03 ± 0.10	0.5
9. Z-D-Ala	0.405± 0.15	-0.12 ± 0.10	0.5
10. Z-L-Abu	2.68 ± 0.23	2.62 ± 0.16	1.0
11. Z-D-Abu	0.79 ± 0.23	0.70 ± 0.16	1.0
12. Z-L-Val	2.53 ± 0.40	1.12 ± 0.26	1.3
13. Z-D-Val	1.35 ± 0.40	0.34 ± 0.26	1.3
14. Z-L-Nva	3.20 ± 0.23	2.95 ± 0.16	1.5
15. Z-D-Nva	1.46 ± 0.23	1.14 ± 0.16	1.5
16. Z-L-Leu	3.18 ± 0.23	2.70 ± 0.16	1.8
17. Z-D-Leu	1.30 ± 0.23	1.12 ± 0.16	1.8
18. Z-L-Nle	3.40 ± 0.23	2.81 ± 0.16	2.0
19. Z-L-Asn	3.52 ± 0.23	2.58 ± 0.16	-1.21
20. Z-D-Asn	0.34 ± 0.23	0.37 ± 0.16	-1.21
21. Z-L-Phe	3.70 ± 0.23	4.21 ± 0.15	2.63
22. Z-D-Phe	1.35 ± 0.23	1.98 ± 0.15	2.63
23. Z-L-Trp	3.86 ± 0.30	> 4.2	2.64
24. Z-L-Lys	2.68 ± 0.23	1.26 ± 0.15	0.84[b]

Légende du TABLEAU XII.

[a] Valeurs calculées à partir des données de Fujita et coll., (1964) ; Hansch et coll., (1968). [b] Leo et coll., (1971).

Fig. 10 - Constante de spécificité de désacylation S_d des Z-L-amino acyl-enzymes et des Z-D-amino acyl-enzymes ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO$-enzyme) en fonction de la longueur l du groupe acyle R_2^1CHCO (l est exprimée en Å et a été mesurée, à partir du carbone du carbonyle, au moyen de modèles moléculaires en supposant une structure totalement allongée). O, Z-L-amino acyl-chymotrypsines ; ●, Z-D-amino acyl-chymotrypsines ; ◉, Z-glycylenzyme. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau XII.


4.0
3.0
2.0
1.0
0
4.0
6.0
8.0
10.0
l_c Å
5
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

- Hydrolyse chymotrypsique des esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-acylés

. Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques lors de l'hydrolyse chymotrypsique d'esters paranitrophényliques d'acides aminés N-α-acylés.

Les valeurs expérimentales des constantes cinétiques k_3, K_1'' et K_m obtenues lors de l'hydrolyse par l'α-chymotrypsine des esters de paranitrophénol des différents amino acides N-α-acylés sont données dans le Tableau X. Nous avons utilisé l'équation de TAFT-INGOLD, établie pour l'hydrolyse enzymatique des esters paranitrophényliques d'acides carboxyliques, afin de séparer les effets polaires, stériques et spécifiques qu'exercent les substituants lors des étapes d'acylation et de désacylation enzymatique de ces dérivés d'acides aminés. Les effets spécifiques des substituants sont respectivement caractérisés par la constante de spécificité S_d pour la désacylation et par la constante de spécificité S_a pour l'acylation. Les valeurs des constantes polaires σ^* et stériques E_s pour les substituants $R_1NHCOCH(R_2)$- des esters paranitrophényliques d'acides aminés N-α-acylés sont reportées dans le Tableau XI. Les différentes valeurs des constantes de spécificité S_d et S_a sont rapportées dans le Tableau XII.

- Effets des substituants sur la constante de vitesse de désacylation k_3

Sur la figure 10 sont représentées les valeurs des constantes de spécificité S_d pour la désacylation des N-α-benzyloxycarbonyl-L ou D-amino acyl-enzymes ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO$-Enzyme) en fonction de la longueur du groupe acyle

R_2CHCO-. Globalement, ces acyl-enzymes se désacylent plus rapidement que les acyl-enzymes dont le groupe acyle ne contient pas de carbone asymétrique en α du carbonyle : les valeurs de S_d correspondantes sont supérieures.

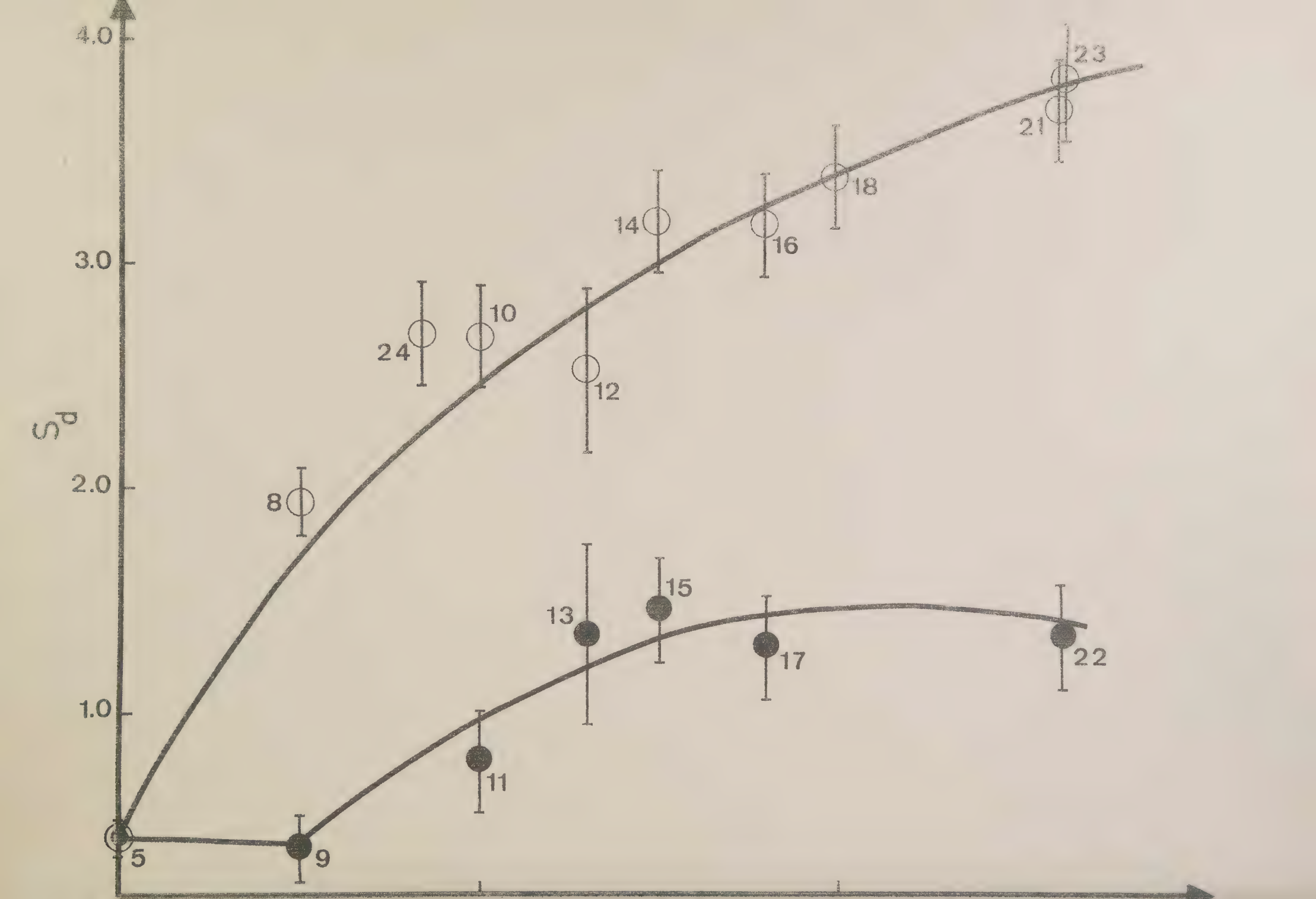
En ce qui concerne les isomères de configuration L, nous observons une brusque variation de S_d entre la Z-glycyl-α-chymotrypsine (n° 5) et la Z-L-alanyl-α-chymotrypsine (n° 8) : cette variation correspond à l'apparition du carbone asymétrique en α du carbonyle. Puis, au fur et à mesure de l'allongement de la chaîne latérale, S_d devient plus importante ; l'optimum étant atteint pour le Z-L-phénylalanyl-enzyme (n° 21) et le Z-L-tryptophanyl-enzyme (n° 23), c'est-à-dire pour une chaîne latérale d'environ 10 Å. Pour les isomères de configuration D, la désacylation spécifique existe encore ($S_d > 0$), mais l'amplitude des valeurs de S_d est moindre ; par ailleurs, la transition entre la Z-glycyl-α-chymotrypsine (n° 5) et la Z-D-alanyl-α-chymotrypsine disparaît.

La stéréospécificité n'est pas absolue et dépend de la nature du groupe protecteur de la fonction α-aminée. En effet, d'une part la For-L-alanyl-α-chymotrypsine (n° 6) et la For-glycyl-α-chymotrypsine (n° 1) possèdent des valeurs[≡] voisines de S_d, ($S_{d(6,1)} = 0{,}32$), alors que les S_d du Z-L-alanyl-enzyme (n° 8) et du Z-glycyl-enzyme (n° 5) sont très

---

[≡] $S_{d(x,y)}$ représente la différence entre la valeur de S_d pour le substituant n° x et la valeur de S_d pour le substituant n° y. Pour deux énantiomères, il faut remarquer que $S_{(L,D)} = \log k_{3,L}/k_{3,D}$. Ces remarques s'appliquent également aux constantes de spécificité d'acylation S_a.

Fig. 11 - Constante de spécificité de désacylation S_d des Z-L-amino acyl-enzymes et des Z-D-amino acyl-enzymes ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO$-enzyme) en fonction de π , "constante hydrophobe" de la chaîne latérale R_2H. O, Z-L-amino acyl-chymotrypsines ; ●, Z-D-amino acyl-chymotrypsines ; ⊙, Z-glycylenzyme. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau XII. Les Z-L-asn- et Z-D-asn-enzyme ne sont pas portés sur la figure car leurs valeurs de S_d en fonction de π sont en dehors du graphe.


4.0
3.0
2.0
1.0
S_d
5
9
11
13
15
17
22
8
24
10
12
14
16
18
21
23

différentes, ($S_{d(8,5)}$= 1,48) ; d'autre part, la différence entre les valeurs de S_d pour le For-L-alanyl-enzyme (n° 6) et le For-D-alanyl-enzyme (n° 7), ($S_{d(6,7)}$ = 0,53), est inférieure à la différence observée entre le Z-L-alanyl-enzyme (n° 8) et le Z-D-alanyl-enzyme (n° 9), ($S_{d(8,9)}$ = 1,53). Il semble donc bien, d'après ces résultats, que le groupe N-acyle du substrat doive posséder une taille suffisante pour permettre une bonne "stéréoreconnaissance" de ce dernier par l'enzyme.

Nous avons également tenté de trouver une relation entre les valeurs des constantes de spécificité S_d avec la constante "hydrophobe" π des substituants R_2H (les valeurs de π sont données dans le Tableau XI. Ainsi que le montre la figure 11, il n'y a pas de relation linéaire entre les valeurs de S_d et de π , mais plutôt une courbe de saturation.

Le comportement du Z-L-asparaginyl-enzyme (n° 19) est surprenant. Bien que la chaîne latérale R_2 de ce dérivé comporte un groupe polaire, il se désacyle[*] aussi rapidement que la Z-L-norvalyl-α-chymotrypsine (n° 14), dont la longueur de la chaîne latérale est équivalente (cf Fig. 10). Ce phénomène n'est pas observé avec la N-α-Z-L-lysyl-α-chymotrypsine (n° 24) en comparaison avec la Z-L-norleucyl- ou la Z-L-phénylalanyl-α-chymotrypsine (n° 18 et 21). La réactivité du N-α-Z-L-lysyl-enzyme suit plutôt celle de la N-α-Z-L-aminobutyryl-α-chymotrypsine (n° 10) dont la chaîne latérale R_2 possède un caratère hydrophobe comparable (cf Fig. 11).

---

[*] Nous avons vérifié que l'hydrolyse enzymatique de ce composé à pH acide (pH = 5) a lieu avec la formation d'un acyl-enzyme intermédiaire, ainsi que le montre la production des jets de paranitrophénol dans les premiers instants de la réaction. Les produits de la réaction sont la Z-L-asparagine et le paranitrophénol (voir la partie expérimentale, Matériel et Méthodes.

Fig. 12 - Constante de spécificité d'acylation S_a des Z-L-amino acid-ONp et des Z-D-amino acid-ONp ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO-OC_6H_4pNO_2$) en fonction de la longueur l du groupe acyle $R_2\diagdown CHCO$ (l est exprimée en Å et a été mesurée, à partir du carbone du carbonyle, au moyen de modèles moléculaires en supposant une structure totalement allongée). O, Z-L-amino acid-ONp ; ●, Z-D-amino acid-ONp ; ⊙, Z-gly-ONp. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau XII. La valeur de S_a pour le Z-L-Trp-ONp n'est pas portée sur la figure à cause de l'incertitude dans la valeur de S_a (la valeur de K_m étant trop faible pour être estimée).

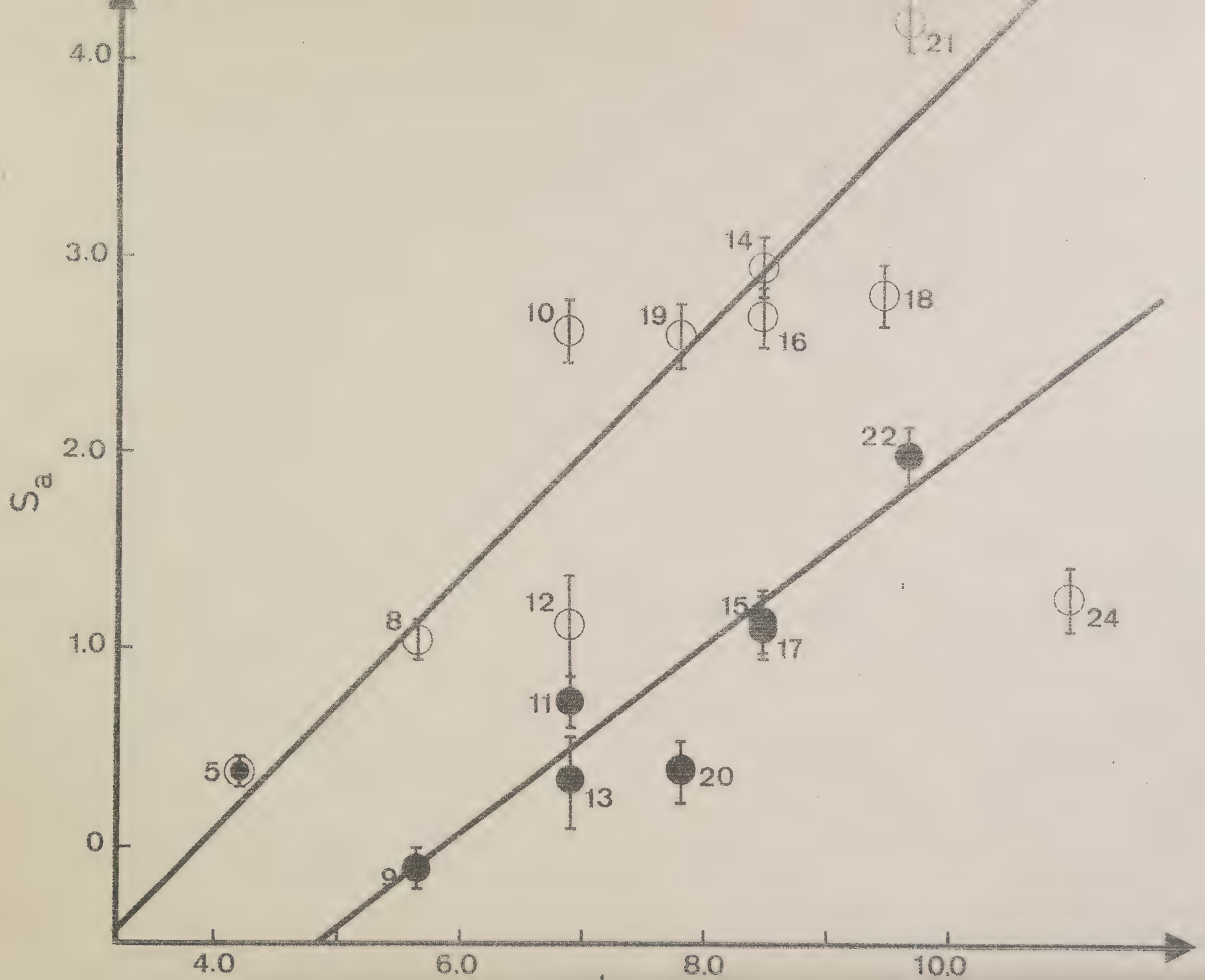
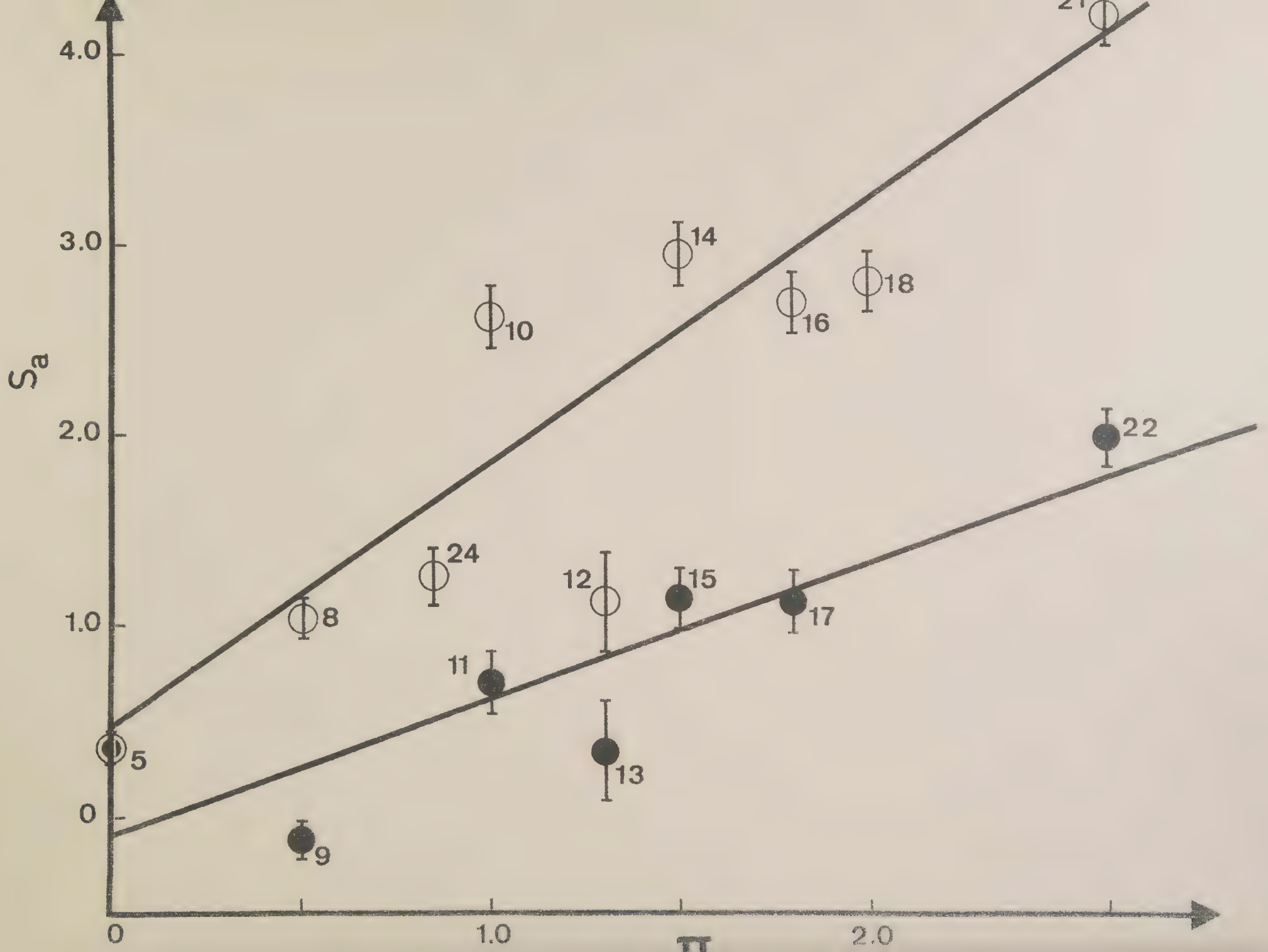

S_a
4.0
3.0
2.0
1.0
0
4.0
6.0
8.0
10.0
21
14
18
10
19
16
22
12
15
24
8
17
11
5
20
13
9

Fig. 13 - Constante de spécificité d'acylation S_a des Z-L-amino acid-ONp et des Z-D-amino acid-ONp ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO-OC_6H_4pNO_2$) en fonction de π, "constante hydrophobe" de la chaîne latérale R_2H. O, Z-L-amino acid-ONp ; O, Z-D-amino acid-ONp ; ⊙, Z-gly-ONp. Les numéros se rapportent aux composés du Tableau XII. Les composés Z-L-asn-ONp et Z-D-asn-ONp ne sont pas portés sur la figure car les valeurs de S_a en fonction de π sont en dehors du graphe. De même le Z-L-Trp-ONp n'est pas inclus à cause de l'incertitude dans la valeur de S_a (la valeur de K_m étant trop faible pour être estimée).


4.0
3.0
2.0
1.0
0
S_a
0
1.0
2.0
Π
5
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
21
22
24

- Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m

Les représentations des constantes de spécificité d'acylation S_a pour les esters paranitrophényliques des acides aminés N-α-benzyloxycarbonylés ($C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)COOC_6H_4pNO_2$) en fonction de la longueur du groupe acyle R_2CHCO (Fig. 12) ou en fonction de la constante "hydrophobe" de la chaîne latérale R_2H (Fig. 13) font apparaître quelques résultats différents de ceux que l'on peut observer pour l'étape de désacylation quand on considère le même type de représentation. En effet, le caractère principal qui ressort des figures 12 et 13 est une tendance à la linéarité bien que les coefficients de corrélation soient mauvais.

Ainsi, nous trouvons pour les constantes de spécificité d'acylation des Z-L-amino acides, à l'exception de la Z-L-valine (n° 12) et de l'asparagine (n° 19), la relation 27 :

$$S_a = (1,38 \pm 0,17)\pi + (0,47 \pm 0,29) \qquad (27)$$

avec n = 8 composés ; r = 0,945.

Si le composé n° 12 est inclus dans le calcul de la corrélation, les paramètres linéaires ne changent pratiquement pas, hormis leurs variances et le coefficient de corrélation r :

$$S_a = (1,38 \pm 0,22)\pi + (0,35 \pm 0,38) \qquad (28)$$

avec n = 9 composés ; r = 0,898.

Pour les acides aminés de configuration D, nous obtenons la relation 29 :

$$S_a = (0,70 \pm 0,15)\pi + (-0,09 \pm 0,26) \qquad (29)$$

avec n = 7 composés ; r = 0,875.

De même que pour l'étape de désacylation, la nature du groupe N-α-acyle joue un rôle important dans la "stéréoreconnaissance" du substrat par l'enzyme quand ce substrat possède une chaîne latérale R_2 courte. Les valeurs de S_a pour les esters paranitrophényliques de la For-L-alanine (n° 6) et de la For-Glycine (n° 1) sont voisines et respectivement égales à - 0,196 et - 0,44 alors que celles des esters paranitrophényliques de la Z-L-alanine (n° 8) et de la Z-glycine (n° 5) sont plus éloignées et égales à 1,03 et 0,36. De plus, la différence entre les valeurs de S_a pour les esters de paranitrophénol de la For-L-alanine (n° 6) et de la For-D-alanine (n° 7), ($S_{a(6,7)}$ = 0,194) est inférieure à celle de la Z-L-alanine (n° 8) et de la Z-D-alanine (n° 9), ($S_{a(8,9)}$ = 1,15).

Ces différences sont moins importantes que les différences trouvées pour l'étape de désacylation. Ce phénomène est en relation avec les valeurs de K_m plus favorables dans le cas des dérivés de configuration D et de la Z-Glycine.

- Effets des substituants sur le pK_1'' mesuré lors de la désacylation des acylamino acyl-enzymes

Des changements relativement importants (≃ 0,9 unité pH) sont observés dans les valeurs des pK_1'' pour la

désacylation des différents N-acylamino acyl-enzymes (cf Tableau X). Ce phénomène est inattendu si l'on considère, d'une part, les propriétés électroniques comparables des divers substituants et, d'autre part, la relation trouvée par HANSCH (1972). Cette relation avait été établie entre les valeurs des pK_1'' et les constantes polaires σ^* des substituants, lors de la désacylation d'acyl-enzymes dont le groupe acyle ne comporte pas de carbone asymétrique.

Exception faite des N-acyl-alanyl-enzymes et, à un moindre degré, des N-acyl-phénylalanyl-enzymes, la valeur du pK_1'' est généralement supérieure pour la désacylation de l'acyl-enzyme comportant un N-acyl-L-amino acide quand on la compare au pK_1'' pour la désacylation du N-acyl-D-amino acyl-enzyme correspondant. Il est intéressant de constater que plus la chaîne latérale R_2 des N-acyl-L ou D-amino acyl-enzymes est hydrophobe, plus élevée est la valeur du pK_1''. A pH acide, HENDERSON (1970) a montré que l'oxygène carbonylique du groupe acyle de l'indole-acryloyl-α-chymotrypsine est en interaction avec l'imidazole de l'histidine 57 par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène via une molécule d'eau. Cette interaction pourrait être renforcée quand la chaîne latérale R_2 du substrat est plus hydrophobe, peut-être à cause d'une meilleure orientation des groupes en contact dans l'acyl-enzyme.

. Discussion

- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation

Quand on considère les N-α-Z-L-amino acyl-enzymes de formule générale $C_6H_5CH_2OCONHCH(R_2)CO$-Enzyme, les conditions requises pour une bonne spécificité sont les suivantes :

La constante de spécificité S_d sera d'autant plus élevée que la chaîne latérale R_2 sera plus longue. La longueur optimale, environ 10 Å, est atteinte pour les dérivés de la phénylalanine et du tryptophane. JONES et coll. (1965) avaient déjà indiqué que pour l'hydrolyse chymotrypsique d'une série d'esters méthyliques d'acides aminés N-α-acétylés de formule générale $CH_3CONH-CH(\ (CH_2)_n\ H\ )\ COOCH_3$, la constante de vitesse atteignait un maximum pour n = 5.

L'augmentation des constantes de spécificité de désacylation pour les Z-L-amino acyl-enzymes ne suit pas linéairement le caractère apolaire du substituant R_2 bien qu'une certaine tendance à la linéarité soit observée si nous excluons le dérivé de la Z-glycine. Il est vraisemblable que la spécificité enzymatique dépend également de la forme des substituants (HAYASHI et LAWSON, 1969) et de leur taille en relation avec la géométrie du site actif.

Le N-α-Z-L-asparaginyl-enzyme, au contraire de la N-α-Z-L-lysyl-α-chymotrypsine, se désacyle plus rapidement que l'on pouvait le prévoir compte tenu du caractère polaire

de la chaîne latérale R_2. Les raisons d'un tel phénomène ne sont pas claires. Cependant, COHEN et coll. (1970) ont rapporté que la présence de groupes amides situés en différents endroits de la molécule de substrat pouvait faciliter l'hydrolyse chymotrypsine. D'autre part, il faut remarquer que l'α-chymotrypsine peut rompre des liaisons peptidiques dont le composant acyle est l'asparagine (NEIL et coll. 1966).

Dans le cas des N-α-Z-D-amino acyl-enzymes, nous observons une relation positive, mais atténuée, entre les valeurs des constantes de spécificité S_d et la longueur ou le caractère apolaire de la chaîne latérale R_2. La comparaison des valeurs de S_d pour ces D-amino acyl-enzymes et pour les acyl-enzymes dérivés d'acides carboxyliques simples indique que la présence du carbone asymétrique en α du carboxyle n'entraîne ni un effet positif important ni un effet très défavorable pour la catalyse enzymatique. Par exemple, les valeurs de S_d pour la Z-D-phénylalanyl-α-chymotrypsine (S_d = 1,35) et pour la 3-phénylpropionyl-α-chymotrypsine (S_d = 1,27) sont comparables. Ce comportement des Z-D-amino acyl-enzymes est différent de celui observé par INGLES et KNOWLES (1967) pour les N-α-acétyl-D-amino acyl-enzymes. En effet, ces derniers se désacylent progressivement plus lentement que l'acétylglycyl-enzyme, au fur et à mesure de l'accroissement de la taille de la chaîne latérale R_2 des acides aminés. Les auteurs ont alors introduit pour ces dérivés le concept de spécificité négative : mieux un substrat de configuration L est hydrolysé par l'enzyme, moins bien l'isomère D correspondant est reconnu.

Pour rendre compte de ce phénomène, INGLES et KNOWLES (1967) ont suggéré qu'un dérivé d'acide aminé de configuration D était fixé sur l'enzyme en trois points de la même façon qu'un substrat de configuration L, mais qu'alors le carbonyle de la liaison sensible du substrat se positionnait dans une direction inverse et défavorable par rapport aux groupes catalytiques de l'enzyme.

Ce modèle ne peut pas rendre compte du comportement des Z-D-amino acyl-enzymes dont le groupe N-α-acyle est plus encombrant. Dans ce cas, la fixation sur l'enzyme ne doit pas être très différente de celle de substrats dont le groupe acyle ne comporte pas de carbone asymétrique comme par exemple le Z-glycyl-enzyme et le 3-phénylpropionyl-enzyme ; l'interaction possible de la liaison du type "peptidique" du groupe acyl-aminé avec un résidu accepteur d'une liaison hydrogène dans l'enzyme, comme dans le cas des acides aminés de configuration L (HENDERSON, 1970), serait absente. Une autre hypothèse serait de considérer que les substituants R_1 et R_2 peuvent se fixer sur l'enzyme en différents endroits pour donner des complexes productifs dans le cas de ces Z-D-amino acyl-enzymes.

Un point particulier de nos résultats est la réactivité importante de la Z-L-alanyl-α-chymotrypsine par rapport à celle de la Z-glycyl- et de la Z-D-alanyl-α-chymotrypsine. Lorsque le substituant N-acylamino R_1CONH ne comporte pas une partie apolaire, comme dans le cas des dérivés N-formylamino ($R_1 = H$), la réactivité intrinsèque de l'isomère de configuration L est comparable à celle de la glycine et la stéréospécificité de l'enzyme est diminuée. HEIN et NIEMANN (1962b)

ont comparé l'hydrolyse par l'α-chymotrypsine des énantiomères de la formyl- et de l'acétyl-phénylalanine-OMe dont la chaîne latérale est plus longue que celle des dérivés de l'alanine. Ils ont indiqué que l'hydrolyse des dérivés N-formylés était moins stéréospécifique que celle des dérivés N-acétylés. Ces observations suggèrent que la dimension du groupe fixé sur le carbone asymétrique représente un facteur important de la stéréospécificité exercée par l'α-chymotrypsine.

Le rôle joué par le groupe amide dans la réactivité de l'enzyme vis-à-vis des substrats spécifiques est bien connu (HEIN et NIEMANN, 1962a, b ; INGLES et KNOWLES, 1968), mais il a été démontré récemment que ce rôle avait été surestimé (SILVER et coll., 1970 ; PATTABIRAMAN et LAWSON, 1972). La comparaison des valeurs de la constante de spécificité S_d pour la désacylation des Z-amino acyl-enzymes et des acyl-enzymes dans lesquels la fonction acyl-amino est absente montre que la contribution positive du groupe OCONH à la constante de vitesse de désacylation varie dans la gamme de 1 à 300. Par exemple, la différence entre les valeurs de S_d pour la Z-L-phénylalanyl-α-chymotrypsine et la 3-phénylpropionyl-α-chymotrypsine est égale à 2,47. Il faut remarquer que la contribution du groupe OCONH à la constante de vitesse de l'étape d'acylation est un peu moins importante (entre 1 et 100).

- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation.

La spécificité et la stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation sont comparables à celles

TABLEAU XIII

Stéréospécificité manifestée par l'α-chymotrypsine lors de l'acylation par différents esters d'acides aminés N-α-acylés.

Acides aminés N-α-acylés	ONp [a]		OMe [b]
	$\frac{(k_{cat}/K_m)_L}{(k_{cat}/K_m)_D}$	$\frac{(k_{cat})_L}{(k_{cat})_D}$	$\frac{(k_{cat}/K_m)_L}{(k_{cat}/K_m)_D}$
Z-Gly	1	1	1
For-Ala	1.57	3.42	-
Z-Ala	14.1	33.8	> 17 [c]
Z-Val	6.11	15.	> 14
Z-Abu	83.8	76.8	> 200 [d]
Z-Nva	64.6	54.7	> 2,650 [d]
Z-Leu	38.05	75.4	> 16,000
Z-Phe	171.	216	> 420,000

[a] Rapport des valeurs données dans le Tableau X. [b] Rapport des valeurs pour les esters méthyliques d'acides aminés N-α-acétylés (Silver et Matta, 1972). [c] Pour l'hydrolyse chymotrypsique des esters méthyliques des N-benzoyl-L- et -D-alanine, le rapport $\frac{(k_{cat}/K_m)_L}{(k_{cat}/K_m)_D}$ est d'environ 8, à T = 25° ; pH = 7,9 ; 0,1 M NaCl (Rapp et coll., 1966). [d] Calculés à partir des valeurs données par Jones et coll., (1965), selon Silver et Matta, (1972).

TABLEAU XIV

Comparaison des constantes de vitesse du second ordre pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par les esters méthyliques d'acides aminés N-α-acétylés ou N-α-benzoylés et d'esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-carbobenzoxylés.

Acides Aminés	k_{cat}/K_m ($M^{-1}sec^{-1}$)			Rapports de k_{cat}/K_m	
	N-Ac-amino acid OMe	N-Bz-amino acid OMe	N-Z-amino acid ONp [f]	N-Z-amino acid ONp / N-Ac-amino acid OMe	N-Z-amino acid ONp / N-Bz-amino acid OMe
Gly	0.42 [a] 0.1265 [b]	73.1 [b] 26.5 [c]	8.38 10^4	2 10^5 6.6 10^5	1.14 10^3 3.16 10^3
Ala	1.72 [a]	24 [d]	15.2 10^4	8.85 10^4	6.35 10^3
Val	1.35 [a] 1.97 [b]	15.35 [b] 9.8 [e]	0.66 10^4	4.9 10^3 3.35 10^3	4.3 10^2 6.75 10^2
Nva	19.6 [a] 21.1 [b]	227 [b]	150 10^4	7.65 10^4 7.1 10^4	6.6 10^3
Nva	264 [a] 356 [b]	2382 [b]	306 10^4	1.16 10^4 0.86 10^4	1.06 10^3
Nle	1250 [a] 3000 [b]		212 10^4	1.7 10^3 0.7 10^3	
Leu	1325 [a]		174 10^4	1.315 10^3	
Phe	42,000 [a] 104.000 [b]	8.79 10^5 [b]	8,156 10^4	1.94 10^3 0.785 10^3	0.93 10^2

[a] Jones et coll., (1965). Conditions expérimentales : 25°; pH 7.9; 0.1 M NaCl. [b] Berezin et coll., (1971). Conditions expérimentales : 25° ; pH 7.8 ; 0.1 M KCl. [c] Wolf, III, et coll., (1964). Conditions expérimentales : 25°; pH 7.9; 0.5 M NaCl. [d] Rapp et coll., (1966). Conditions expérimentales : 25° ; pH 7.9 ; 0.2 M NaCl. [e] Jones et Niemann, (1962). Conditions expérimentales : 25° ; pH 7.9 ; 0.1 M NaCl. [f] Valeurs du Tableau V.

second ordre k_{cat}/K_m. Là encore les esters paranitrophényliques des N-α-benzyloxycarbonyl-L et D-asparagine se comportent d'une façon anormale : le rapport de stéréospécificité pour l'étape d'acylation $(k_{cat}/K_m)_L/(k_{cat}/K_m)_D$ (égal à 161) est beaucoup plus bas que le rapport de stéréospécificité de l'étape de désacylation $(k_{cat})_L/(k_{cat})_D$ (égal à 1495).

On peut se demander si la spécificité de l'α-chymotrypsine vis-à-vis des esters paranitrophényliques d'acides aminés N-α-acylés est semblable à la spécificité manifestée par l'enzyme vis-à-vis de substrats dont le groupe partant est "mauvais".

Dans le Tableau XIV, nous avons rassemblé les valeurs des constantes de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m obtenues lors de l'acylation de l'α-chymotrypsine par les esters paranitrophényliques des N-α-Z-L-amino acides, les esters méthyliques des N-α-acétyl-L-amino acides (JONES et coll., 1965 ; BEREZIN et coll., 1971) et les esters méthyliques des N-α-benzoyl-L-amino acides (JONES et NIEMANN, 1962 ; WOLF III et coll., 1964 ; RAPP et coll., 1966 ; BEREZIN et coll., 1971). L'acylation de l'α-chymotrypsine par ces trois séries de composés suit des corrélations structure-réactivité comparables. Cependant, le rapport $(k_{cat}/K_m)_{ONp}/(k_{cat}/K_m)_{OMe}$ varie avec la nature de l'acide aminé, particulièrement pour les esters méthyliques des N-α-acétyl-amino acides : d'autant moins spécifique est la chaîne latérale de l'acide aminé, d'autant plus important est ce rapport. L'acylation de l'α-chymotrypsine

par les esters méthyliques est par conséquent plus sensible aux changements structuraux de la chaîne latérale des substrats qu'elle ne l'est pour les esters de paranitrophénol.

De plus, comme l'ont montré SILVER et coll., 1970 ; SILVER et MATTA, 1972, cette sensibilité à la nature de l'acide aminé est encore plus importante si l'acide aminé possède la configuration D. Le rapport de stéréospécificité : $(k_{cat}/K_m)_L/(k_{cat}/K_m)_D$ pour l'acylation de l'α-chymotrypsine par les énantiomères de la Z-phénylalanine-ONp est égal à 171 alors qu'on peut l'estimer supérieur à $4,2\ 10^5$ si les substrats considérés sont les énantiomères de la N-acétyl-phénylalanine-OMe (cf Tableau XIII). Les auteurs attribuent ce phénomène à une réactivité particulière des esters paranitrophényliques consécutive au caractère apolaire du groupe partant, le paranitrophénol, et pensent que les esters de paranitrophénol pourraient donner lieu à des fixations multiples et productives avec l'enzyme.

Ce n'est pas là, toutefois, la seule explication possible. Ainsi que nous l'avions indiqué à la fin de la discussion sur la réactivité des esters méthyliques et paranitrophényliques d'acides carboxyliques ne comportant pas de carbone asymétrique, l'étape d'acylation pourrait s'accomplir en passant par la formation d'un complexe tétraédrique. La formation ou la décomposition de cet intermédiaire pourrait être tour à tour l'étape limitante de la réaction d'acylation selon la nature de la fonction acyle. Ainsi, pour l'hydrolyse chymotrypsique des esters paranitrophényliques des Z-L ou D-amino

acides et des esters méthyliques des N-acétyl ou N-benzoyl-L-amino acides dont la chaîne latérale est spécifique, la formation de cet intermédiaire tétraédrique serait l'étape limitante de la réaction d'acylation alors que pour des substrats moins spécifiques comme l'ester méthylique de la N-acétylglycine, se décomposition deviendrait en partie l'étape limitante. POLGAR (1971) a suggéré la possibilité d'une interaction entre cet intermédiaire tétraédrique et l'ion imidazolium de l'histidine 57 ; cette interaction impliquerait la formation d'une liaison hydrogène déformée. Nous pouvons supposer que cette interaction est moins efficace avec des substrats possédant un mauvais groupe partant et une partie acyle non spécifique, la décomposition du complexe tétraédrique en serait rendue plus difficile. D'autre part, CAPLOW et HARPER (1972) ont comparé les vitesses d'hydrolyse des esters méthyliques de la N-acétyl-L-tyrosine et de la N-acétyl-N-méthyl-L-tyrosine en présence d'α-chymotrypsine. Les effets de la structure des substrats sur l'hydrolyse enzymatique sont interprétés en termes de stabilité des états de transition du complexe tétraédrique.

BIBLIOGRAPHIE

- BALLINGER, P., et LONG, F.A. (1960) J. Amer. Chem. Soc. 82, 795

- BENDER, M.J. et NAKAMURA, K. (1962) J. Amer. Chem. Soc. 84, 2577

- BENDER, M.L., SCHONBAUM, G.R. et ZERNER, B. (1962) J. Amer. Chem. Soc. 84, 2540

- BENDER, M.L., CLEMENT, G.E., KEZDY, F.J., et HECK, H. d'A. (1964a), J. Amer. Chem. Soc. 86, 3680

- BENDER, M.L., KEZDY, F.J., et GUNTER, C.R. (1964b) J. Amer. Chem. Soc. 86, 3714

- BENDER, M.L., et KEZDY, F.J. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 3704

- BEREZIN, I.V., LEVASHOV, A.V., et MARTINEK, K. (1970) FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 7, 20

- BEREZIN, I.V., KAZANSKAYA, N.F., et KLYOSOV, A.A. (1971) FEBS (Feb. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 15, 121

- BERNHARD, S.A., et TASHJIAN, Z.H. (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87, 1806

- BERNHARD, S.A., HERSHBERGER, E., et KEIZER, J. (1966) Biochemistry 5, 4120

- BLACKBURN, G.M., et DODDS, H.L.H. (1971) J. Chem. Soc. B., 826

- BLOW, D.M., BIRKTOFT, J.J., et HARTLEY, B.S. (1969) Nature 221, 337

- BROT, F.E., et BENDER, M.L. (1969) J. Amer. Chem. Soc. 91, 7187

- BRUICE, T.C., et SCHMIR, G.L. (1958) J. Amer. Chem. Soc. 80, 148

- BRUICE, T.C., [illegible], S., DOIG, A., et KUNDU, N.G. (1970) J.Amer.Chem.Soc. 92, 1370

- CAPLOW, M., et JENCKS, W.P. (1962) Biochemistry 1, 883

- CAPLOW, M. (1969) J. Amer. Chem. Soc. 91, 3639

- CAPLOW, M., et HARPER, C. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94, 6508

- CHARTON, M. (1964) J. Org. Chem. 29, 1222

- COHEN, S.G., MILOVANOVIC, A., SCHULTZ, R.M., et WEINSTEIN, S.Y. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2664

- COHEN, S.G., VAIDYA, V.M., et SCHULTZ, R.M. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 249

- DUPAIX, A., BECHET, J.J., et ROUCOUS, C. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 464

- FERSHT, A.R., et REQUENA, Y. (1971) J. Amer. Chem. Soc. 93, 7079

- FRANKFATER, A., et KEZDY, F.J. (1971) J. Amer. Chem. Soc. 93, 4039

- FUJITA, T., IWASA, J., et HANSCH, C. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 5175

- HANSCH, C., et ANDERSON, S.M. (1967) J. Org. Chem. 32, 2583

- HANSCH, C., QUINLAN, J.E., et LAWRENCE, G.L. (1968) J. Org. Chem. 33, 347

- HANSCH, C. (1972) J. Org. Chem. 37, 92

- HARDMAN, M.J., VALENZUELA, P., et BENDER, M.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5907

- HAYASHI, Y., et LAWSON, W.B. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4158

- HEIN, G.E., et NIEMANN, C. (1962a) J. Amer. Chem. Soc. 84, 4487

- HEIN, G.E., et NIEMANN, C. (1962b) J. Amer. Chem. Soc. 84, 4495

- HENDERSON, R. (1970) J. Mol. Biol. 54, 341

- HOLMQUIST, B., et BRUICE, T.C. (1969a) J. Amer. Chem. Soc. 91, 2982

- HOLMQUIST, B., et BRUICE, T.C. (1969b) J. Amer. Chem. Soc. 91, 2985

- HUBBARD, C.D., et KIRSCH, J.F. (1970) Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 29, Abstr. 3656

- HUBBARD, C.D., et KIRSCH, J.F. (1972) Biochemistry 11, 2483

- INGLES, D.W., et KNOWLES, J.R. (1967) Biochem. J. 104, 369

- INGLES, D.W., et KNOWLES, J.R. (1968) Biochem. J. 108, 561

- JAFFE, H.H. (1953) Chem. Revs. 53, 191

- JENCKS, W.P., et CARRIUOLO, J. (1960) J. Amer. Chem. Soc. 82, 1778

- JOHNSON, S.L. (1967) Adv. Phys. Org. Chem. 5, 237

- JONES, J.B., et NIEMANN, C. (1962) Biochemistry 1, 1093

- JONES, J.B., KUNITAKE, T., NIEMANN, C., et HEIN, G.E. (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87, 1777

- KIRBY, A.J., et LANCASTER, P.W. (1970) in "Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes", Smellie, R.M.S., Ed., New-York, N.Y., Academic Press, p. 99

- KIRSCH, J.F., et JENCKS, W.P. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 837

- KOLTUN, W.C., et GURD, F.R.N. (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 301

- KOSHLAND, D.E. Jr, et NEET, K.E. (1968) Annu. Rev. Biochemistry 37, 359

- KHURGIN, Y.I. et DMITRIEVA, M.G. (1965) Tetrahedron 21, 2305

- LEO, A., HANSCH, C., et ELKINS, D. (1971) Chem. Rev. 71, 525

- Mc CONN, J., KU, E., HIMOE, A., BRANDT, K.G., et HESS, G.P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2918

- MILSTIEN, J.B., et FIFE, T.H. (1968) J. Amer. Chem. Soc. 90, 2164

- NEIL, G.L., NIEMANN, C., et HEIN, G.E. (1966) Nature 210, 903

- NOSAKI, Y., et TANFORD, C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2211

- PATTABIRAMAN, T.N., et LAWSON, W.B. (1972) Biochem. J. 126, 645

- POLGAR, L. (1971) J. Theor. Biol. 31, 165

- PURDIE, J.E., et BENOITON, N.L. (1970) Can. J. Biochem. 48, 1058

- RAPP, J.R., NIEMANN, C., et HEIN, G.E. (1966) Biochemistry 5, 4100

- SILVER, M.S., STODDARD, M., SONE, T., et MATTA, M.S. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 3151

- SILVER, M.S., et MATTA, M.S. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151, 62

- STEITZ, T.A., HENDERSON, R., et BLOW, D.M. (1969) J. Mol. Biol. 46, 337

- TAFT, R.W. Jr. (1956) in "Steric Effects in Organic Chemistry", Newman, M.S., Ed., New-York, N.Y., Wiley, p. 586

- WELLS, P.R. (1962) Chem. Revs. 62, 171

- WILLIAMS, A. (1970) Biochemistry 9, 3383

- WILLIAMS, A., et SALVADORI, G. (1971) J. Chem. Soc. (B), 2401

- WOLF III, J.P., WALLACE, R.A., PETERSON, R.L., et NIEMANN, C. (1964) Biochemistry 3, 94

- ZERNER, B., et BENDER, M.L. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 3669

C O N C L U S I O N

CONCLUSION

Un nombre limité de corrélations a été trouvé entre les structures des substrats et leurs réactivités relatives dans un système enzymatique donné. Nous avons essayé d'utiliser une telle démarche pour préciser la spécificité et la stéréospécificité de l'α-chymotrypsine. Pour ce faire, l'hydrolyse enzymatique d'esters paranitrophényliques d'acides carboxyliques simples de formule générale $RCOOC_6H_4pNO_2$ a été étudiée d'une part. D'autre part, le comportement de l'α-chymotrypsine vis-à-vis des esters paranitrophényliques d'acides aminés de configurations L et D et de formule générale $R_1NHCOCH(R_2)COOC_6H_4pNO_2$ a été analysé. Ces études ont été effectuées à 25° dans une gamme de pH allant de 6 à 8.

Les effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre (k_{cat}/K_m) et la constante de vitesse de désacylation (k_3) ont été analysés en utilisant l'équation de TAFT-INGOLD ; les contributions des effets polaires, stériques et spécifiques ont pu ainsi être séparées. Nous avons été conduit à définir pour chaque substrat une constante de spécificité S, notée S_a pour l'étape d'acylation et S_d pour l'étape de désacylation. Ces différentes valeurs des constantes de spécificité ont été discutées par rapport à la structure des substrats.

En ce qui concerne le premier type de substrat, différentes caractéristiques ont été soulignées :

1. La désacylation est favorisée quand la fonction acyle de l'acyl-enzyme possède les propriétés structurales suivantes :

- une longueur optimale de la chaîne, estimée à 10-12 Å.
- le caractère apolaire de la terminaison de la chaîne
- la libre rotation de la molécule autour de la liaison $C^{\beta}—C^{\gamma}$.

2. D'une façon générale, les mêmes propriétés structurales de la fonction acyle du substrat favorisent les étapes d'acylation et de désacylation. Les différences observées entre ces deux étapes semblent principalement dues à des modifications de la constante de dissociation enzyme-substrat (K_s) en fonction de la structure du substrat. Lors de l'étape d'acylation, la réactivité enzymatique suit pratiquement un processus d'extraction, de l'eau vers un milieu apolaire.

En ce qui concerne les dérivés d'acides aminés, les caractéristiques de l'étape de désacylation sont les suivantes :

- augmentation de la vitesse d'hydrolyse quand s'allonge la chaîne latérale de l'acide aminé
- un comportement apparemment non linéaire entre la constante de spécificité S_d et la constante π ,

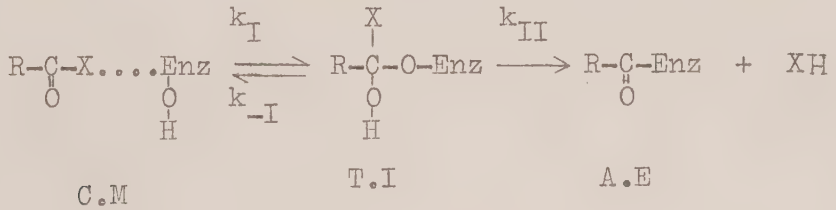
relative au caractère hydrophobe du substituant de la chaîne latérale R_2.

Les constantes de vitesse de la désacylation des acyl-enzymes dérivés des N-α-acylamino acides de configuration L ou D obéissent aux mêmes lois, mais l'amplitude des effets observés est moindre dans le cas des isomères de configuration D. Nous n'avons pas relevé d'exemple de spécificité négative pour la désacylation des acyl-enzymes dérivés des N-α-benzyloxycarbonyl-D-amino acides vis-à-vis de la désacylation des isomères L correspondants. La stéréospécificité n'est pas absolue et dépend de la nature du substituant R_1 de la fonction α-aminée : ce substituant doit être d'une taille suffisante pour permettre une bonne reconnaissance stéréochimique des substrats par l'enzyme.

Bien que l'étape d'acylation révèle de nombreux points communs avec l'étape de désacylation, elle présente cependant quelques particularités. Ainsi, la constante de spécificité d'acylation S_a augmente linéairement avec la constante π , reflétant le caractère hydrophobe de la chaîne latérale R_2 de l'acide aminé. De plus, les effets stéréospécifiques constatés lors de l'étape d'acylation sont moins importants que les effets manifestés au cours de l'étape de désacylation : ces différences sont en accord avec les valeurs des constantes de Michaëlis obtenues dans le cas des dérivés de configuration D.

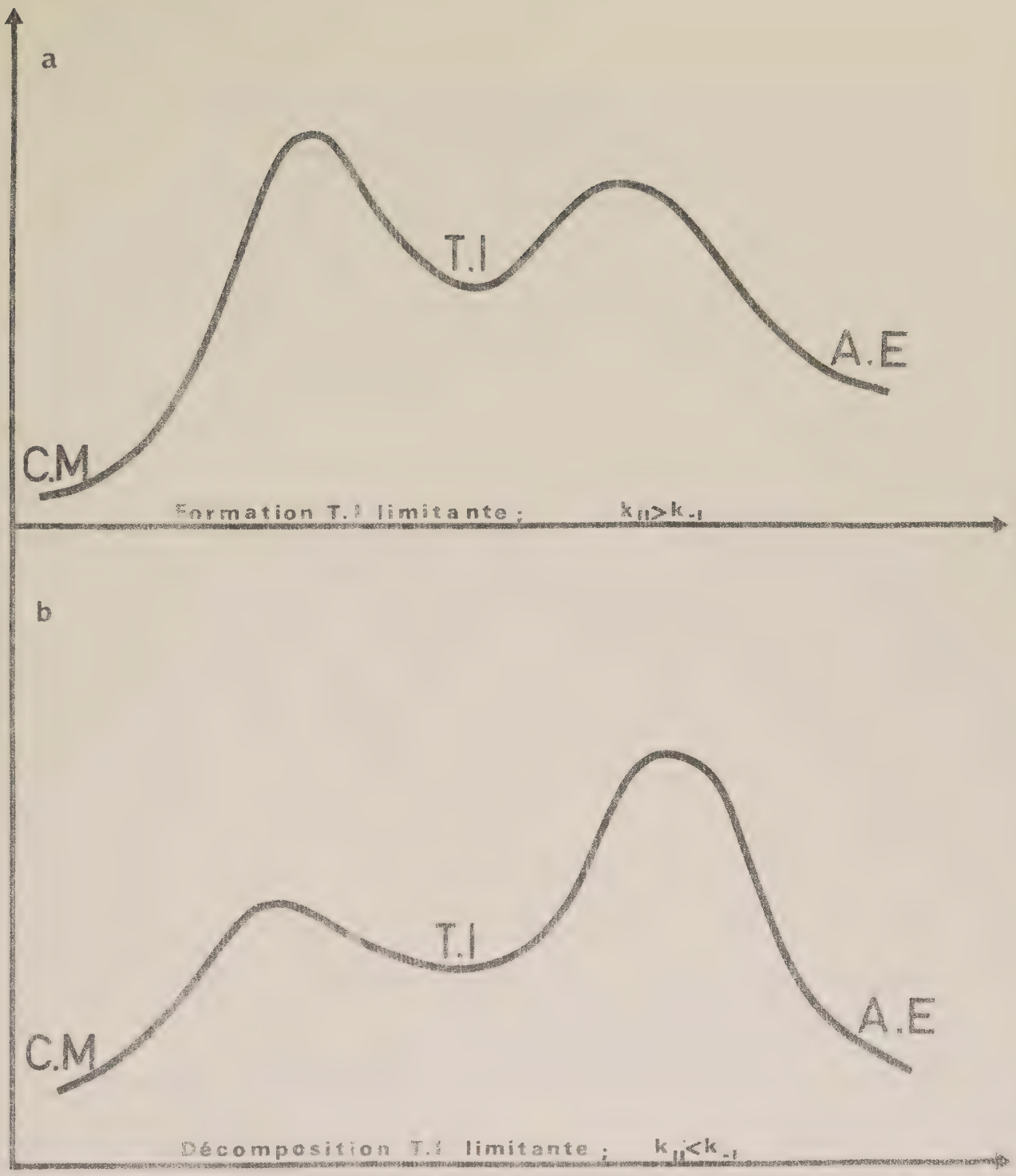
La comparaison des valeurs de la constante de vitesse d'acylation du second ordre (k_{cat}/K_m) pour les esters paranitrophényliques et les esters à "mauvais groupes partants" montre que l'hydrolyse enzymatique de ces derniers est plus sensible aux changements structuraux des substrats. Ce phénomène

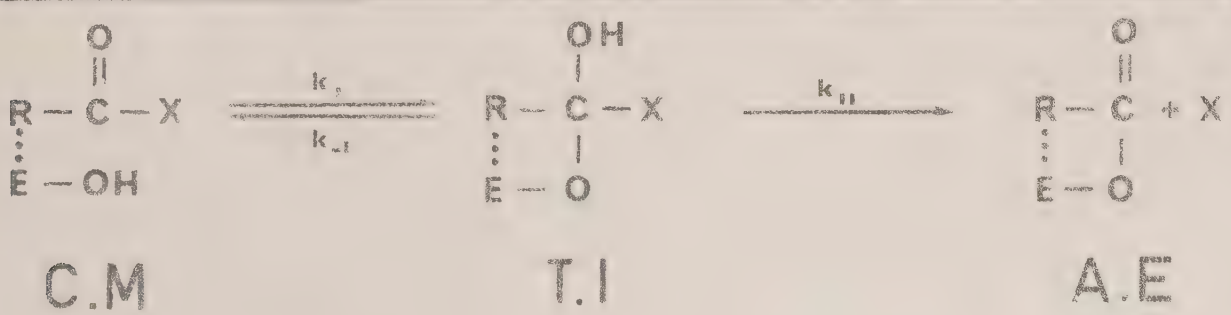
est vérifié aussi bien pour les esters d'acides carboxyliques simples que pour les esters d'acides aminés. Plusieurs raisons ont été invoquées pour l'expliquer. Il est vraisemblable, pour une certaine part, que l'interaction du groupe partant aryloxy avec la surface de l'enzyme peut favoriser la réaction en abaissant la valeur du K_s des esters paranitrophényliques par rapport à la valeur du K_s des esters éthyliques ou méthyliques. Tout récemment, PLATZER et coll. (1972) ont montré, qu'outre la poche hydrophobe révélée par cristallographie (STEITZ et coll., 1969), trois autres points de fixation existaient au site actif de la protéine et pouvaient recevoir également les chaînes latérales des substrats. Toutefois, ce résultat n'est pas expérimental mais théorique. Les auteurs l'ont obtenu par le calcul empirique des conformations de plus basse énergie pour certains substrats de l'α-chymotrypsine, isolés ou en interaction avec l'enzyme. D'autre part, un changement dans la nature de l'étape limitante conduisant à la formation ou à la décomposition du complexe tétraédrique peut apporter une certaine contribution à la différence de réactivité observée entre les esters à "bon ou à mauvais groupes partants". Dans le schéma 4 :



la constante globale de la vitesse de la réaction est égale à $k_2 = k_I\, k_{II}/k_{-I} + k_{II}$. La nature de l'étape limitante de la

Fig. 14 - Diagramme énergétique correspondant à la formation et à la décomposition du complexe tétraédrique T.I ; 14a, $k_{II} > k_{-I}$, formation du complexe tétraédrique limitante ; 14b, $k_{II} < k_{-I}$, décomposition du complexe tétraédrique limitante.


a
T.I
A.E
C.M
Formation T.I limitante ; $k_{II} > k_{-I}$
Energie libre
b
T.I
A.E
C.M
Décomposition T.I limitante ; $k_{II} < k_{-I}$


k_I
k_{-I}
k_{II}
C.M
T.I
A.E

réaction est déterminée par les grandeurs relatives de k_{-I} et de k_{II}. La formation du complexe tétraédrique TI sera l'étape limitante si $k_{II} > k_{-I}$ et la constante de vitesse de la réaction sera alors $k_2 = k_I$. Dans le cas où $k_{II} < k_{-I}$, la décomposition du complexe tétraédrique TI devient l'étape limitante et l'équation de la constante de vitesse égale à $k_2 = k_{II} \cdot k_I/k_{-I}$. Nous voyons ainsi comment, dans cette réaction séquencée, le changement de l'étape limitante entraîne une diminution de la vitesse observée. Nous avons représenté sur la figure 14 les diagrammes énergétiques correspondant à la formation et à la décomposition du complexe tétraédrique TI pour les substrats spécifiques et les substrats à "bon groupe partant" (14a), et pour les substrats à "mauvais groupe partant" (14b). L'observation directe de cet intermédiaire a pu être menée à bien dans quelques exemples de la chimie organique (JENCKS, 1959 ; CORDES et JENCKS, 1962 ; ROBINSON, 1970) ; jamais encore sa mise en évidence expérimentale n'a été possible dans une réaction enzymatique. Il pourrait y avoir là tout un domaine à explorer, à condition de choisir convenablement le système à étudier et le mode de détection.

Quoi qu'il en soit, nous espérons avoir pu montrer comment l'utilisation de relations linéaires d'énergie libre peut permettre, dans un cas favorable, de quantifier les problèmes de spécificité et de stéréospécificité dans les différentes étapes cinétiques d'une réaction enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

- CORDES, E.H., et JENCKS, W.P. (1962) J. Amer. Chem. Soc. 84, 4319

- JENCKS, W.P. (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 475

- PLATZER, K.E., MOMANY, F.A., et SCHERAGA, H.A. (1972) Int. J. Peptide Protein Res. 4, 201

- ROBINSON, D.R. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 3138

- STEITZ, T.A., HENDERSON, R., et BLOW, D.M. (1969) J. Mol. Biol. 46, 337

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION..... 1-7

MATERIEL et METHODES..... 8-16

- Préparation des substrats
- Pouvoirs rotatoires des dérivés d'acides aminés
- Mesure des pK de certains acides aminés N-α-acylés
- Mesures cinétiques
- Bibliographie

RESULTATS et DISCUSSION..... 17-56

- Généralités..... 17-26
  - Notions d'efficacité et de spécificité enzymatique
  - Cinétique formelle
  - Estimation des constantes polaires et stériques des substituants
- Hydrolyse chymotrypsine des esters de paranitrophénol d'acides carboxyliques simples..... 26-43
  - Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques :
    - Effets des substituants sur la constante de vitesse de désacylation k_3
    - Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m
    - Effets des substituants sur le pK''_1

Pages

. Discussion

- Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation

- Efficacité et spécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation

- Comparaison de l'hydrolyse enzymatique d'esters méthyliques et d'esters paranitrophényliques

- Hydrolyse chymotrypsique des esters de paranitrophénol d'acides aminés N-α-acylés..... 43-56

. Séparation des effets polaires, stériques et spécifiques :

- Effets des substituants sur la constante de vitesse de désacylation k_3

- Effets des substituants sur la constante de vitesse d'acylation du second ordre k_{cat}/K_m

- Effets des substituants sur le pK''_1

. Discussion

- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape de désacylation

- Spécificité et stéréospécificité de l'α-chymotrypsine dans l'étape d'acylation

- Bibliographie

CONCLUSION..... 61-65